

**Direkte und indirekte *in vitro* Suppression der Replikation  
subgenomischer Hepatitis C Virus Replicons**

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Biologie und Geographie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Ruth Bröring

aus Damme  
Dezember 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Klinik für innere Medizin am Universitätsklinikum Essen durchgeführt, eine Einrichtung der Universität Duisburg-Essen.

- 1. Gutachter: Prof. J. F. Schlaak**
- 2. Gutachter: Prof. E. Winterhager**
- 3. Gutachter: Prof. U. Dittmer**

**Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. D. Hoffmann**

**Tag der mündlichen Prüfung: 9. April 2008**

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	vi
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	x
<b>Tabellenverzeichnis</b>	xii
<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>13</b>
1.1 Das Hepatitis C Virus	13
1.1.1 Virusaufbau und Replikationszyklus	14
1.1.2 HCV Replicon Systeme	15
1.2 Die Leber	17
1.2.1 Das Organ und seine Funktionen	17
1.2.2 Der anatomische Aufbau	18
1.3 Das Immunsystem	20
1.3.1 Adaptive Immunantwort	20
1.3.2 Angeborene Immunantwort	21
1.3.2.1 Familie der <i>toll-like</i> Rezeptoren (TLR)	22
1.3.2.2 Signalweiterleitung	23
1.3.3 Interferone	26
1.3.3.1 Interferon induzierte Gene	26
1.3.3.2 JAK-STAT Signalweg	27
1.3.3.3 Einsatz von Interferonen zur Therapie von HCV	29
1.4 Zielsetzung der Versuche	31
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	<b>32</b>
2.1 Zellkultur	32
2.1.1 Isolation von Primärzellen aus der Leber	32
2.1.2 FACS Analyse	35
2.2 <i>in vitro</i> Stimulationen	36
2.2.1 Erstellen von IFN-Dosiskurven für MH1 und MH2	36
2.2.1.1 Isolierung von totaler RNA aus Gewebekultur	37
2.2.1.2 Quantitative <i>realtime</i> PCR	37

2.2.2	Behandlung von MH1 Zellen mit Agonisten der <i>toll-like</i> Rezeptoren	39
2.2.3	Untersuchung antiviraler Aktivität von KC und LSEC nach der Stimulation mit TLR Agonisten	40
2.2.3.1	Blockierung der antiviralen Wirkung mittels neutralisierender Antikörper	40
2.2.3.2	Toleranzinduktion durch Vorstimulation der NPZ mit IL-10 und TGF $\beta$	41
2.2.4	Suppression der Genexpression von ISGs mittels siRNA	41
2.3	Nachweis von Proteinen	43
2.3.1	Extraktion von Proteinen	43
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.3.3	Western Blot	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	HCV Replikation in den murinen Replicon Systemen MH1 und MH2	47
3.1.1	Verlauf der Replikation der viralen RNA	47
3.1.1.1	Exemplarische Darstellung der <i>realtime</i> PCR Daten für den Verlauf der HCV Replikation in den MH2 Zellen	49
3.1.2	Interferonsensitivität des HCV Replicons	51
3.1.2.1	Exemplarische Darstellung der <i>realtime</i> PCR Daten für den Rückgang der HCV Replikation unter dem Einfluß von IFN $\alpha$	53
3.1.3	Expression und Stimulation der <i>toll-like</i> Rezeptoren in MH1 Zellen	55
3.2	Suppression der HCV Replikation	62
3.2.1	Reinheit der Kupffer Zellen und sinusoidalen Endothelzellen der Leber	63
3.2.2	Poly I:C und LPS induzieren in KC und LSEC eine antivirale Wirkung	66
3.2.2.1	Blockierung der Wirkung durch neutralisierende Antikörper	68
3.2.2.2	Einfluss einer Vorinkubation mit IL-10 und TGF $\beta$	71

3.3	siRNA vermittelter Gen- <i>Knockdown</i> der ISGs, Effizienz und IFN vermittelte Induzierbarkeit	73
3.3.1	Gen- <i>Knockdown</i> und die Auswirkungen auf die HCV Replikation und die Interferonantwort	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Das MH1 Replicon System	79
4.1.1	TLR 3 Agonist poly I:C hemmt die HCV Replikation	79
4.2	Die Leber und ihre Beteiligung am angeborenen Immunsystem	81
4.2.1	TLR 3 und TLR 4 induzieren eine antivirale Antwort in den NPZ	82
4.2.2	Einsatz von TLR Agonisten zur therapeutischen Unterstützung bei der Behandlung von Viruserkrankungen	84
4.3	Einfluss ausgesuchter ISGs auf die HCV Replicon Replikation	85
4.3.1	Expression der ISGs	85
4.3.2	Suppression der Genexpression der ISGs mittels siRNA	86
4.3.3	Antivirale Funktionen des ISG15	87
4.3.3.1	ISG15 und die Wirkung auf HCV	87
4.4	Ausblicke	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>102</b>
7.1	Chemikalien-Verzeichnis	102
7.2	Sequenzanalyse	105

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µm	Micrometer
A	Adenosin
AK	Antikörper
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DC	Dendritic cells
DMEM	Dulbecos modified eagle Media
DNA	Desoxyribonucleic acid
dsRNA	doppelsträngige RNA
E1	Envelope 1
E2	Envelope 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMCV	Encephalomyocarditis virus
ER	Endoplasmatisches Ritikulum
ERK	extracellular response kinase
EVR	early viral reponse
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKS	Fötales Kälber Serum
FSC	Forward-scattered light
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung
GAS	gamma assoziierte Sequenz
GBP	Guanylat bindende Proteine
GBSS	Gay's balanced salt solution
HBV	Hepatitis B Virus

HCV	Hepatitis C Virus
HeLa	humane Epithelzellen (Patient: Henrietta Lacks)
Hepa1-6	Hepatomzelllinie 1-6 murin
Herc5	Hect domain and RCC1-like domain 5
HKLM	heat-killed preparation of <i>Listeria monocytogenes</i>
HuH7	Humane Hepatomzelllinie 7
IFI-6-16 (G1P3)	Interferon induced protein 6-16
IFI-T1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha Rezeptor
IFNBR	Interferon beta Rezeptor
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor
IRES	internal ribosomal entry site
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IRAK1	Interleukin 1 Rezeptor assoziierte Kinase 1
IRAK4	Interleukin 1 Rezeptor assoziierte Kinase 4
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
IRF7	Interferon regulierender Faktor 7
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISGF3	ISG Faktor 3
ISRE	IFN-stimulated response element
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
KC	Kupffer cells
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
log <sub>10</sub>	Logarithmus zur Base 10
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	liver sinusoidale endothelial cells
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
max IC <sub>50</sub>	Maximal inhibitorische Konzentration von 50%

mDC	myeloid dendritic cells
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
Mx2	Myxovirus resistance 2
MyD88	Myeloid differentiation marker 88
NaCl	Natrium Chlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
neo	Gen für Neomycin-Resistenz
NFκB	nuclear factor κ B
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzellen
NOD	nucleotide binding oligomerization domain
NPZ	nicht-parenchymatöse Zellen
NS	Nichtstrukturprotein
ODN1826	Oligodesoxynucleotide 1826
p7	Protein 7 (Ionenkanal des HCV)
Pam3CSK4	palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine-4,
PAMP	pathogene associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
peg	pegüliert
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PKR	Proteinkinase R
POC	proof of concept
poly I:C	polyinosine-polycytidylic acid



PRR	Pathogen recognition receptor
RBV	Ribavirin
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rotations per minute
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	standard error of mean
siRNA	small interfering RNA
SN	supernatant (Zellkulturüberstand)
SR-B1	scavenger receptor class B type 1
SSC	side-scattered light
ssRNA	single stranded RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVR	sustained viral response
T	Thymin
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TIR	Toll / Interleukin 1 Rezeptor
TIRAP	TIR domain containig adaptor protein
TLR	Toll like receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAF6	TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containig adaptor molecule inducing IFN $\beta$
U	Units
Ubch8	UBE2L6 ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
Ube1L	ubiquitin-activating enzyme E1-like
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
UTR	untranslated region

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite	
Abb. 1	Schematische Darstellung eines Hepatitis-C-Virus Partikel	15
Abb. 2	Schematische Darstellung des HCV Genoms	16
Abb. 3	Darstellung der Mengenverhältnisse der unterschiedlichen Leberzellpopulationen	19
Abb. 4	Vereinfachte Darstellung der TLR Signalwege	25
Abb. 5	Vereinfachte Darstellung des Typ I IFN induzierten JAK-STAT Signalweg	28
Abb. 6	Replikation der HCV RNA in den murinen MH1 und MH2 Zellen	48
Abb. 7	Zunahme der Fluoreszenzintensität mit fortschreitendem PCR Zyklus I	50
Abb. 8	Dosisabhängige Suppression der HCV Replikation durch Typ-I und -II IFN	52
Abb. 9	Zunahme der Fluoreszenzintensität mit fortschreitendem PCR Zyklus II	54
Abb. 10	TLR Stimulation in MH1	56
Abb. 11	Interferonantwort auf Expressionsebene	58
Abb. 12	Expression und Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$	61
Abb. 13	Darstellung einer FACS Analyse zur Bestimmung der Reinheit der Kupffer Zellen	64
Abb. 14	Darstellung einer FACS Analyse zur Bestimmung der Reinheit der sinusoidalen Endothelzellen der Leber	65
Abb. 15	Poly I:C und LPS vermittelte Suppression der HCV Replikation in MH1 durch NPZ	67
Abb. 16	Neutralisierende Antikörper gegen IFN $\beta$ blockieren die poly I:C und LPS vermittelte Suppression der HCV Replikation	69
Abb. 17	TLR vermittelte IFN $\beta$ Expression in NPZ bleibt von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren unbeeinflusst	73

Abb. 18	siRNA vermittelter Gen- <i>Knockdown</i> der ISGs	75
Abb. 19	Rückgang der HCV Replicon Replikation durch IFN $\alpha$ während der Suppression der Genexpression der ISGs in den con1 Zellen	76
Abb. 20	Rückgang der HCV Replicon Replikation durch IFN $\alpha$ während der Suppression der Genexpression der ISGs in den MH1 Zellen	78

<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	<b>Seite</b>
Tabelle 1 humane toll-like Rezeptoren, ihre Liganden und deren Vorkommen	22
Tabelle 2.1 Primersequenzen, Bestellnummern und Temperatur der Primerhybridisierung der murinen Primer	38
Tabelle 2.2 Primersequenzen und Temperatur der Primerhybridisierung der humanen Primer	39
Tabelle 3 verwendete siRNAs	43
Tabelle 4 Verdünnung und Inkubationszeiten der Antikörper	45
Tabelle 5 exemplarische Darstellung von realtime PCR Daten (Rohdaten) I	51
Tabelle 6 exemplarische Darstellung von realtime PCR Daten (Rohdaten) II	53
Tabelle 7 dosisabhängige Geninduktion von ISG15 und IFI-T1 durch poly I:C	57
Tabelle 8 Grundexpression der TLR 1-9 in MH1 und Hepa1-6	62
Tabelle 9 dosisabhängige Geninduktion von IFN $\beta$ nach Stimulation der TLR 3 und TLR 4	70
Tabelle 10 IL-10 und TGF $\beta$ haben keinen Einfluss auf die TLR vermittelte antivirale Aktivität in nicht-parenchymatösen Leberzellen <i>in vitro</i>	71
Tabelle 11 IFN $\alpha$ vermittelte Geninduktion	74
Tabelle 12 IFN $\alpha$ Behandlung bei Suppression der ISG-Expression mittels siRNA	77

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zur Familie der Flaviviridae und ist der einzige Vertreter des Genus der Hepaciviren. Es sind sechs Genotypen charakterisiert, die sich wiederum in unterschiedliche Subtypen unterteilen lassen. Die Verbreitung der unterschiedlichen Genotypen wird bestimmten geographischen Regionen zugeordnet, wobei die in den USA und Europa vorwiegenden Hepatitis C Viren den Genotypen 1 und 2 zuzuordnen sind. Als Hauptinfektionswege sind bekannt 1) die Transfusion mit infizierten Blutkonserven, 2) Kanülenstichverletzungen bei Krankenhauspersonal, 3) ungeschützter Geschlechtsverkehr sowie 4) die Verwendung gemeinsamer Spritzen unter Drogenkonsumenten.

Gelangt das Virus in den Blutkreislauf, wird es über infizierte Makrophagen zur Leber transportiert und infiziert dort die eigentlichen Wirtszellen, die Hepatozyten (Modrow und Falke 1997).

Die akute Infektion verläuft meist asymptomatisch und entwickelt sich in bis zu 70% der Fälle zu einer persistierenden und chronischen Infektion der Leber, und verursacht in diesem Stadium Leberzirrhosen und hepatozelluläre Karzinome (Hoofnagle 2002). Die Diagnose der Infektion erfolgt häufig erst in der chronischen Phase und nach dem Auftreten der ersten Beschwerden, was die Therapie erschwert, und in vielen Fällen eine Lebertransplantation erforderlich macht.

Die Standardtherapie ist bis heute der Einsatz von Interferon  $\alpha$  als Monotherapie oder in Kombination mit dem Virusstatikum Ribavirin. Abhängig von den Genotypen und weiteren Patienten bezogenen Faktoren, wie das Körpergewicht, das Alter oder der fortgeschrittene fibrotische sowie zirrhotische Zustand der Leber, führt diese Therapie bei 50-80% der Patienten zu einem anhaltenden Rückgang der Viruslast. Ein Impfstoff gegen das Hepatitis C Virus konnte bisher noch nicht entwickelt werden (Manns et al 2001, Fried M W et al 2002 und Hadziyannis et al 2004).

### 1.1.1 Virusaufbau und Replikationszyklus

Das Genom des HCV ist ein 9,6 kb langer RNA Einzelstrang in Positiv-Orientierung. Es enthält nur einen Leserahmen, der ein Polyprotein codiert, das die gesamten viralen Struktur- und Nicht-Strukturproteine enthält, und auf der 5'- und 3' Seite von untranslatierten Regionen (UTR) eingefasst wird. Die 5'UTR enthält einen sehr konservierten Bereich mit einer speziellen ribosomalen Bindestelle, der HCV IRES, die es dem Virus ermöglicht, die für Eukaryoten typische 5'Cap-abhängige Translation zu umgehen (Spahn et al 2001). Das Polyprotein wird nach der Translation durch virale und wirtsspezifische Proteasen prozessiert und in die einzelnen Proteine zerlegt. Vom N-terminalen Ende aus entstehen so die Strukturproteine, das Capsid-Protein (core), die glycosylierten Hüllproteine E1 (engl. Envelope) und E2 sowie der Ionenkanal (p7) und die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4A und NS4B sowie NS5A und NS5B. Die Nicht-Strukturproteine haben zum größten Teil proteolytische Funktionen und stellen die Enzyme zur RNA Replikation, wobei NS3 als Helikase wirkt und NS5B als RNA abhängige RNA Polymerase. Weitere Aufgaben der NS-Proteine sind die Funktionen als Cofaktor, Ionenkanal, Phosphoprotein oder NTPase (Abbildung 2).

Der genaue Replikationszyklus des HCV ist noch nicht aufgeklärt, könnte aber vereinfacht wie folgt beschrieben werden. Das E2 Protein in der Membranhülle des Viruspartikel bindet an die Oberflächenproteine CD81, SR-B1 (engl. Scavenger receptor classB type1) und weitere bisher nicht identifizierte Proteine und gelangt über Endozytose in die Wirtszelle (Bartenschlager et al 2004 und Pileri et al 1998). Durch ein Ansäuern des Milieus im Endosom kommt es zur Fusion der viralen und wirtseigenen Membranen und das virale Genom gelangt in das Cytoplasma der Zelle, wo es zuerst als mRNA zur Synthese des viralen Polyproteins dient. Dieses wird durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen Struktur- und Nicht-Strukturproteine zerlegt. Die virale Proteinbiosynthese erfolgt an der Membran des ER (Endoplasmatischen Retikulum), wo die viralen Proteine in räumlicher Nähe zu einander positioniert werden. Die in die Membran integrierten E1 und E2 Proteine ragen ins Lumen des ER, während Core und NS-Proteine auf der cytoplasmatischen Seite

positioniert sind. Hier erfolgt nun die Synthese der genomischen ssRNA. Hierzu dient der Positivstrang zur Synthese von mehreren Negativsträngen, anhand derer neue genomische ssRNA synthetisiert wird. Diese wird an das Capsid Protein gekoppelt oder dient als mRNA zur Synthese weiterer Virusproteine. Neue Viruspartikel (schematische Darstellung siehe Abb. 1) entstehen nun über Abknospungen (engl. Budding) in das ER-Lumen und werden auf dem zelleigenen, sekretorischen Weg aus der Zelle geschleust. (Lindenbach, Rice 2005 und Brass et al 2006).

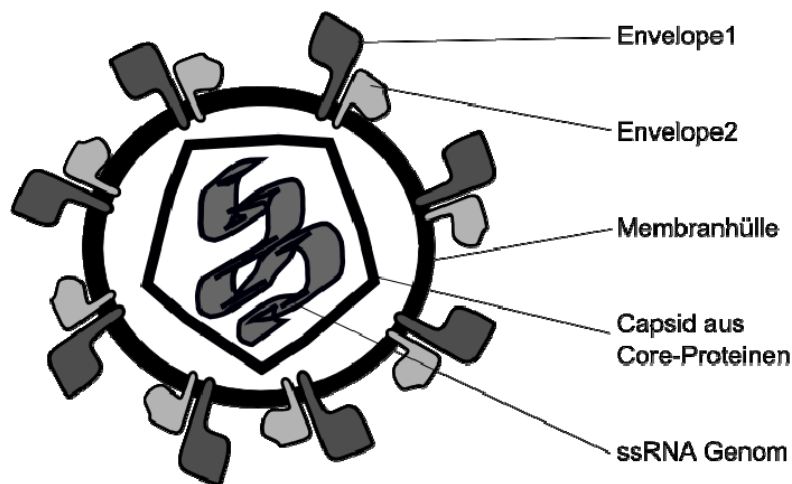


Abb. 1 **Schematische Darstellung eines Hepatitis-C-Virus Partikels.** Das HCV besitzt eine von der Wirtszelle stammende Membranhülle, in der die Envelope-Proteine 1 und 2 verankert sind. Das virale Genom ist von einem Capsid aus Core-Proteinen umgeben.

### 1.1.2 HCV Replicon Systeme

Das Hepatitis C Virus lässt sich nur bedingt zu Forschungszwecken einsetzen, da es nicht möglich ist, Zellsysteme *in vitro* mit dem Virus zu infizieren. Lediglich die Infektion von Schimpansen mit dem HCV ist möglich, wobei die Tiere eine leichte, akute HCV Infektion entwickeln, die dann nach einigen Wochen wieder abklingt. Das Schimpansenmodell wird zur Entwicklung von Impfstoffen verwendet (Shata et al 2002, Youn et al 2005).

Ebenfalls erfolgreich war die Generierung eines chimären Mausmodells, das durch transgene Veränderungen transplantiertes humanes Lebergewebe

annimmt, das wiederum durch die Hepatitis Viren infiziert werden kann (Mercer et al 2001).

Ein Meilenstein in der HCV Forschung war die Entwicklung von HCV Replicon Systemen. Der Prototyp war ein subgenomisches und bicistronisches Konstrukt, das ein Neomycin Phosphotransferase Gen als Selektionsmarker und hinter einer weiteren, viralen Ribosomen-Bindestelle den Leserahmen für die Nicht-Strukturproteine des HCV Genotyp 1b Klon, *con1* enthielt. Die Transfektion dieses Konstruktes in die humane Hepatomzelllinie HuH-7 führte zur Entstehung von G418-resistenten Kolonien, welche das selbstreplizierende HCV Konstrukt enthalten (Lohmann et al 1999).

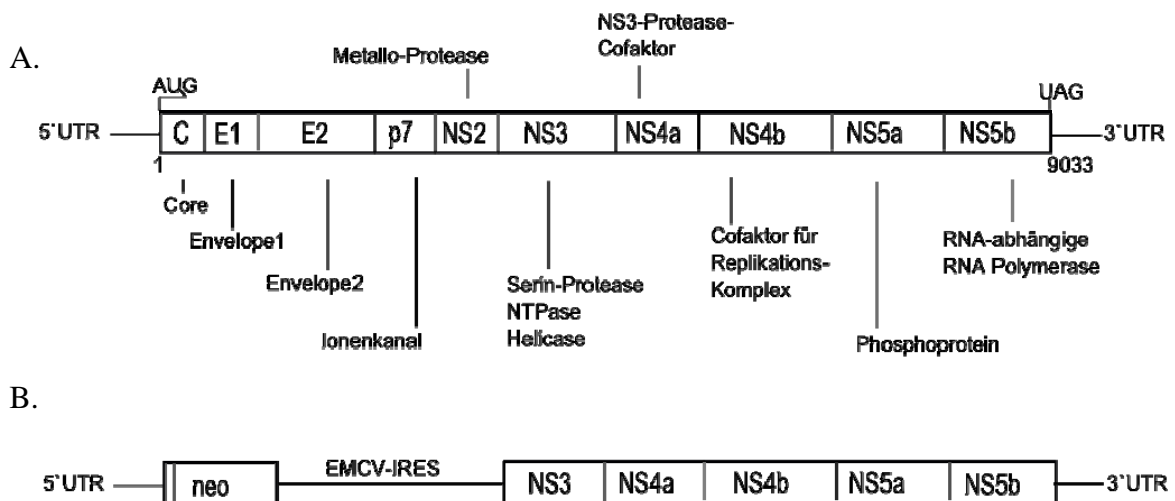


Abb. 2 **Schematische Darstellung des HCV Genoms.** (A) zeigt das HCV Genom, der einzelne Leserahmen codiert für die gesamten viralen Proteine und wird flankiert von den untranslatierten Regionen (UTR). Das bicistronische Replicon Konstrukt (B) enthält hinter der viralen Ribosomenbindestelle eine mit dem N-terminalen Bereich des Core-Proteins gekoppelte Resistenzkassette für Neomycin. Die viralen Nichtstrukturproteine (NS) sind hinter eine zusätzliche Ribosomenbindestelle (EMCV-IRES) geschaltet und codieren den Bereich von NS3 bis zur 3'UTR.

Nach dem Vorbild dieses Konstruktes entstanden weitere Replicons mit unterschiedlichen Bereichen für die NS-Proteine aus Sequenzen verschiedener Klone der HCV Genotypen 1 und 2 (Blight et al 2003 und Kato et al 2003).



Auffällig an den Replicon Systemen war das vermehrte Auftreten von Mutationen in den Bereichen für die Proteine NS3 und NS5A sowie NS4B und NS5B. Es handelte sich hierbei um adaptive Mutationen, die den Klonen für die jeweiligen Zellsysteme einen Replikationsvorteil verschaffen (Blight et al 2000, Evans et al 2004 und Lohmann et al 2003). Durch das Wissen über die hohe Anpassungsfähigkeit dieser Systeme konnten bereits hoch adaptierte Replicons aus HuH-7 Zellen in die nicht hepatische humane Epithel-Zelllinie HeLa sowie in die murine Hepatomzelllinie Hepa1-6 transfiziert werden (Zhu et al 2003).

Nach der Etablierung der subgenomischen HCV Replicons war der nächste Schritt die Konstruktion von genomischen Replicons, mit dem Ziel der *in vitro* Produktion von infektiösen HCV Partikeln. Die adaptiven Mutationen, die nach der Transfektion der RNA in die Zellen entstanden, waren jedoch der Grund, warum in den Replicon Systemen keine HCV Partikel produziert wurden. Erst die Verwendung eines HCV Genotyp 2 Klons, der ohne adaptive Mutationen *in vitro* repliziert, führte zu der gewünschten Produktion von infektiösen HCV Partikeln in Zellkultursystemen (Pietschmann et al 2002, Blight et al 2002, Lindenbach et al 2005 und Wakita et al 2005).

Mit Hilfe der Replicon Systeme ist es heute möglich, die viralen Replikationsprozesse, die Adsorption des Virus auf der Zelloberfläche, die Partikelaufnahme in die Zellen als auch die Produktion und den Zusammenbau neuer Viruspartikel zu untersuchen.

## 1.2 Die Leber

### 1.2.1 Das Organ und seine Funktionen

Die Leber ist die größte menschliche Drüse und erfüllt wichtige Funktionen wie den Metabolismus von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fettsäuren aber auch von Lipoproteinen, Plasma-Proteinen und Vitaminen. Die für den Organismus benötigten Nährstoffe gelangen über die Pfortader aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber und werden über ein verzweigtes Kapillarsystem zu den Hepatozyten geleitet. Hier erfolgt die Extraktion der Nährstoffe aus dem Blut und deren Verstoffwechselung. Kohlenhydrate können bei zu hohem

Vorkommen durch Umbau gespeichert oder zur Produktion von Fetten verwendet werden. Eine weitere Funktion der Leber ist die Proteinsynthese, zum Beispiel von Bluteiweißen wie Albumin und Fibrinogen. 50% der in der Leber synthetisierten Proteine werden in den Blutkreislauf sezerniert. Auch die Synthese von Gallensäuren sowie weiterer Bestandteile der Galle findet in der Leber statt. Sie werden über den Lebergang zur Gallenblase geleitet und von dort aus in den Darm abgegeben. Die neben den Nährstoffen in die Leber gelangenden Gifte werden aus dem Blut entfernt und abgebaut (Lippert 2003 und Gemsa et al 1997).

Neben der Stoffwechselfunktion ist die Leber an der Immunabwehr beteiligt. Über die Leberarterie gelangt im Körper zirkulierendes Blut in das Organ und mit ihm pathogene Mikroorganismen, während die Pfortader neben den absorbierten Nährstoffen sowohl harmlose, körperfremde Antigene als auch Pathogene zur Leber führt. Das Immunsystem der Leber muss also auf infektiöse Pathogene mit einer effektiven Immunantwort reagieren, auf der anderen Seite jedoch eine, für den gesamten Organismus geltende Toleranz gegenüber den harmlosen Antigenen vermitteln (Knolle und Gerken 2000).

### 1.2.2 Der anatomische Aufbau

Die Leber besteht aus dem rechten und dem linken Leberlappen. Sie sind durch eine Furche von einander getrennt; hier treten Pfortader und Leberarterie, aber auch Lymphgefäße und Nerven in das Organ ein und Hohlvene und Gallengang aus. Das Lebergewebe setzt sich aus Leberläppchen zusammen, die mit einer Bindegewebsschicht umhüllt sind und einen Durchmesser von etwa 2 mm aufweisen. Von der Peripherie ausgehend durchziehen kapillare Verästelungen der Pfortader und Leberarterie die Leberläppchen und passieren so die Hepatozyten. In der Mitte der Läppchen liegt die Zentralvene, wo die in den Läppchen vereinten Blutgefäße einmünden. Die Zentralvenen enden in der unteren Hohlvene und führen das Blut zum Herzen (Lippert 2003).

Bei der Betrachtung der Leber auf zellulärer Ebene finden wir neben den Hepatozyten, die sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), die Kupffer Zellen (engl. Kupffer cells, KC) und die Ito-Zellen, auch Sternzellen genannt. Wie in Abbildung

3 dargestellt, machen die Hepatozyten ungefähr 65% der Leberzellen aus, die LSEC stellen 20% der Leberzellen und kleiden die kapillaren Gefäße (Sinusoide) aus. Die LSEC dienen als Barriere zwischen den Bestandteilen des Blutes, wie den Makromolekülen oder Leukozyten, und den Hepatozyten. Makromoleküle werden von ihnen durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und zu den angrenzenden Hepatozyten geleitet, während die Leukozyten ohne direkten Zellkontakt zu den Hepatozyten passieren (Fraser et al 1995). Kupffer Zellen stellen den größten Teil der im Organismus befindlichen sessilen Makrophagen dar. Sie treten vermehrt in den peripheren Bereichen der Pfortader auf, wo sie Pathogene und körperfremde Antigene phagozytieren und somit aus dem Blut eliminieren (Knolle und Gerken 2000). Die Ito-Zellen, die wie die Kupffer Zellen ca. 6% der Leberzellen ausmachen, befinden sich in dem Dissé-Raum, d.h. zwischen den LSEC und den Hepatozyten und speichern Fette und Vitamine (Gemsa et al 1997).

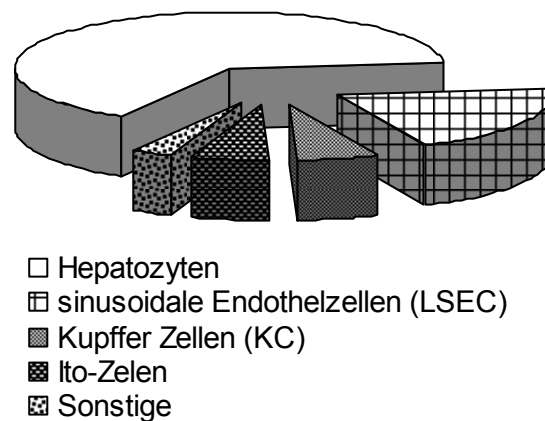


Abb. 3 **Darstellung der Mengenverhältnisse der unterschiedlichen Leberzellpopulationen.** Die Hepatozyten bilden mit 65% die größte Zellfraktion, gefolgt von den LSEC, die 20% der Gesamtzellzahl ausmachen. KC und Ito-zellen machen jeweils 6% der gesamten Leberzellen aus.

Kupffer Zellen und die sinusoidalen Endothelzellen nehmen Antigene durch Endo- oder Phagozytose auf und präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche. Zusammen mit der Ausschüttung von pro-inflammatorischen oder anti-inflammatorischen Zytokinen vermitteln sie die Toleranz gegenüber diesen

Antigenen oder deren Eliminierung durch T-Lymphozyten (Magnusson und Berg 1989, Steffan et al 1986, Gorczynski et al 1995 und Steinbrink et al 1997).

### 1.3 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, körperfremde Substanzen und eindringende Organismen zu erkennen und zu eliminieren. Hierzu gehören Bakterien, Viren, Pilze, einzellige oder mehrzellige Parasiten. Alle Lebewesen verfügen über ein schon früh in der Evolutionsgeschichte entstandenes Abwehrsystem, die angeborene Immunabwehr. Es werden Pathogene erkannt und eliminiert, ohne dass der Organismus ihnen zuvor ausgesetzt gewesen sein muss. Die Erkennung erfolgt über Rezeptoren, die Pathogen assoziierte molekulare Muster erkennen, die von den pathogenen Organismen nicht verändert werden, da diese Strukturen wichtige Bestandteile des Aufbaus und der Replikation darstellen (Janeway und Medzhitov 2002). Die Wirbeltiere entwickelten eine zusätzliche Abwehrfunktion, die adaptive Immunabwehr. Es handelt sich um ein anpassungsfähiges System, das sich ändernde Strukturen von Erregern erkennen kann.

Die Koordination der gesamten Bestandteile des Immunsystems, ihre Interaktion untereinander und die Kommunikation über sezernierte Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Bestandteilen des Komplementsystems ermöglichen eine komplexe Immunreaktion (Borghans et al 1999).

#### 1.3.1 Adaptive Immunantwort

Ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems sind die Lymphozyten, sie bilden die Grundlage für die adaptive Immunantwort. Die Immunantwort unterteilt sich in humorale und zellvermittelte Immunantwort. Erstere wird durch Antikörper vermittelt, die von B-Lymphozyten in die Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blut oder Lymphe abgegeben werden. B-Lymphozyten produzieren klonale Immunglobuline, die sie auf ihrer Oberfläche präsentieren; sie sind unspezifisch und erkennen körperfremde Antigene. Kommt es zum Kontakt zwischen Antikörper und Antigen, führt dies zur Reifung und Vermehrung der B-

Lymphozyten. Es entstehen Plasmazellen, die spezifische Antikörper in großen Mengen produzieren und sezernieren, sowie Gedächtniszellen, die eine lebenslange Immunität gegenüber dem auslösenden Antigen vermitteln. Die zellvermittelte Immunität wird von T-Lymphozyten ausgelöst. Anhand von Oberflächenmarkern unterscheidet man  $CD4^+$  Helfer-T-Lymphozyten ( $T_H$ ) und  $CD8^+$ , zytotoxische Effektor-T-Lymphozyten ( $T_E$ ). Bei den Helfer-T-Lymphozyten unterscheidet man die  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen. Die  $T_H1$ -Zellen regulieren die Proliferation und Funktion aller T-Lymphozyten und somit die zellvermittelte Immunität, während die  $T_H2$ -Zellen an der Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen beteiligt sind und somit das humorale Immunsystem steuern. Die zytotoxischen Effektor-T-Lymphozyten erkennen bestimmte Komplexe auf der Oberfläche Antigen präsentierender Zellen, die sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC). Hier präsentieren die Zellen körpereigene oder, bei Infektionen, pathogene Peptide, die von den  $T_E$  erkannt werden und sie zur Lyse der Antigen präsentierenden Zelle anregen. Gleichzeitig reagieren sie mit Proliferation und der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, wie dem Typ-II Interferon (Interferon  $\gamma$ ).

Die Natürlichen Killer-Zellen (NK) werden ebenfalls zu den Lymphozyten gezählt, sie präsentieren im Gegensatz zu den B- und T-Lymphozyten keine Immunglobuline auf ihrer Oberfläche und sind zusammen mit den nicht-lymphoiden Zellen des Immunsystems wie den Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Epithelzellen an der angeborenen, nicht-adaptiven Immunantwort beteiligt (Modrow und Falke 1997 und Gemsa et al 1997).

### 1.3.2 Angeborene Immunantwort

Das System der angeborenen Immunantwort enthält eine Reihe von Rezeptoren und Signalwegen, deren Gene schon früh in der Evolutionsgeschichte entstanden sind und in hoch konservierter Form, in vielen Organismen wieder zu finden sind. Es handelt sich um Rezeptoren, die bestimmte Strukturen von Krankheitserregern oder Zwischenprodukte in deren Replikationszyklus erkennen. Die Rezeptoren für diese Pathogene befinden sich

auf der Zelloberfläche, in Kompartimenten in der Zelle aber auch im Cytoplasma und lösen nach Bindung des Liganden Signalkaskaden aus, die in den meisten Fällen zur Ausschüttung von Typ-I Interferonen und inflammatorisch wirkenden Zytokinen führen (Janeway und Medzhitov 2002).

### 1.3.2.1 Familie der *toll-like* Rezeptoren (TLR)

Die wichtigste Gruppe der Pathogen erkennenden Rezeptoren sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. toll-like receptors TLRs), ihren Namen erhielten sie wegen der Homologie zum Toll-Rezeptor, der in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) eine Resistenz gegen Pilzbefall vermittelt. Die membranständigen Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche oder in Phago- und Endosomen im Zellinnern, in direkter Exposition zu den einfallenden Pathogenen. Die bis heute identifizierten TLRs und ihre Liganden sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der TLR 3 und die TLR 7-9 erkennen virale Replikationsstufen, aber auch bakterielle Genomstrukturen, während die restlichen TLRs meist bakterielle Membran- oder Proteinstrukturen detektieren (Visvanathan et al 2006, Janeway und Berg 2002 und Hoffmann et al 1999).

Tabelle 1 humane toll-like Rezeptoren, ihre Liganden und deren Vorkommen

TLR	Ligand	Vorkommen
TLR 1	Triacyl Lipopeptide (lösliche Faktoren)	Bakterien, Mycobakterien
TLR 2	modifizierte Lipoproteine und Lipopetide	Vielzahl pathogener Strukturen gram-positiver Bakterien, Mycobakterien
TLR 3	doppelsträngige RNA	Replikationsstufe der meisten Viren
TLR 4	Lipopolysaccharide (LPS)	gram-negative Bakterien, virale Proteine
TLR 5	Flagellin	flagellierte Bakterien
TLR 6	Diacyl-Lipoprotein/Lipopetide	Mycoplasmen, Pilze
TLR 7	einzelsträngige RNA - Imidazoquinolin	virale Genome, Replikationsstufe
TLR 8	einzelsträngige RNA - Imidazoquinolin	virale Genome, Replikationsstufe
TLR 9	CpG Motive in DNA (unmethyliert)	Bakterien und Viren
TLR 10	unbekannt (fehlt im humanen System)	---
TLR 11	unbekannt	uropathogene Bakterien

### 1.3.2.2 Signalweiterleitung

Die Stimulation der Toll-ähnlichen Rezeptoren durch mikrobielle Agenzien führt zur Transkription und Expression immunregulatorischer Zytokine. Eine Gruppe von TLRs (TLR 1, TLR 2, TLR 5 und TLR 6) induziert entzündungsfördernde Zytokine, unter anderen TNF  $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und IL-12 (Interleukin-12), während andere TLRs (TLR 7, TLR 8 und TLR 9) gleichzeitig die Expression von Typ-I Interferonen initialisieren. Die Stimulation von TLR 3 führt zur Expression von IFN  $\beta$  (Interferon  $\beta$ ). Der aktivierte TLR 4 regt sowohl die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen als auch die Expression von IFN  $\beta$  an (Takeda und Akira 2005, Akira et al 2006, Hemmi et al 2002, Hemmi et al 2003, Takeuchi et al 2000, Schnare et al 2000, Hacker et al 2000 und Ito et al 2002).

Wie in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt, erfolgt die Signalweiterleitung nach Bindung eines Liganden bei allen TLRs über eine stark konservierte Domäne im cytoplasmatischen Epitop. Diese Domäne ähnelt der Interleukin-1 Rezeptor Familie und wird deshalb Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) genannt. Das Signal wird hier an das Adapter-Protein MyD88 (Myeloider Differenzierungsmarker 88) weiter gegeben, für TLR 2 und TLR 4 erfolgt dieser Schritt über das zwischengeschaltete Protein TIRAP (TIR Domäne enthaltendes Adapter Protein). Mit Ausnahme des TLR 3 induzieren alle TLRs die MyD88 abhängige Signalkaskade, die über IRAK1, IRAK4 (Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinasen) und TRAF6 (TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6) sowohl MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) aktivieren, als auch den Abbau des NF $\kappa$ B (engl. Nuclear Faktor  $\kappa$ B) -Inhibitors I $\kappa$ B initialisieren, was eine Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern zur Folge hat und die Transkription einer Reihe immunregulatorischer Gene in Gang setzt (Takeda und Akira 2005, Li und Verma 2002). Die endosomal positionierten TLRs aktivieren neben MyD88 auch IRF7 (Interferon regulierender Faktor 7), der über die IRA-Kinasen und I $\kappa$ B-Kinasen phosphoryliert wird und nach Lokalisierung in den Kern die Transkription der Interferongene einleitet (Honda und Taniguchi 2006, Honda et al 2004 und Kawai et al 2004).

TLR 3 aktiviert den MyD88 unabhängigen Signalweg, hier bindet TRIF (engl. TIR Domain containing adaptor inducing IFN  $\beta$ ) die TIR Domäne des TLR und leitet das Signal an eine Gruppe von IKKs (induzierbare I $\kappa$ B Kinasen) weiter, die IRF3 und IRF7 phosphorylieren und somit die Transkription von IFN  $\beta$  induzieren. Der TLR 4 aktiviert über TIRAP die MyD88 abhängige Signalkaskade und gleichzeitig mittels TRAM (engl. TRIF-related adaptor molecule) die TRIF induzierte IFN  $\beta$  Produktion. Ebenfalls über das Adaptermolekül TRIF wird TRAF6 aktiviert und NF $\kappa$ B in den Zellkern überführt, wo es die Transkription der für ihn typischen Gene einleitet (Takeda K und Akira 2005, Seth et al 2006 und Honda und Taniguchi 2006).

Neben den membranständigen TLRs existieren weitere Pathogen erkennende Rezeptoren (engl. Pathogen recognition receptor, PRR) im Cytoplasma der Zellen, wie zum Beispiel RIG-I (engl. Retinoic acid-inducible gene I). Es besitzt eine Helikase-Domäne, womit es im Cytosol vorkommende doppelsträngige RNA (dsRNA) detektiert und die IRF3 abhängige Expression von Typ-I Interferonen initiiert (Yoneyama et al 2004). Eine weitere Gruppe von PRR Molekülen sind die NOD (engl. nucleotide binding oligomerization domain), sie erkennen intrazellulär vorkommende Bakterien, oligomerisieren und aktivieren Kinasen, die wiederum den NF $\kappa$ B Signalweg aktivieren (Inohara et al 2003).



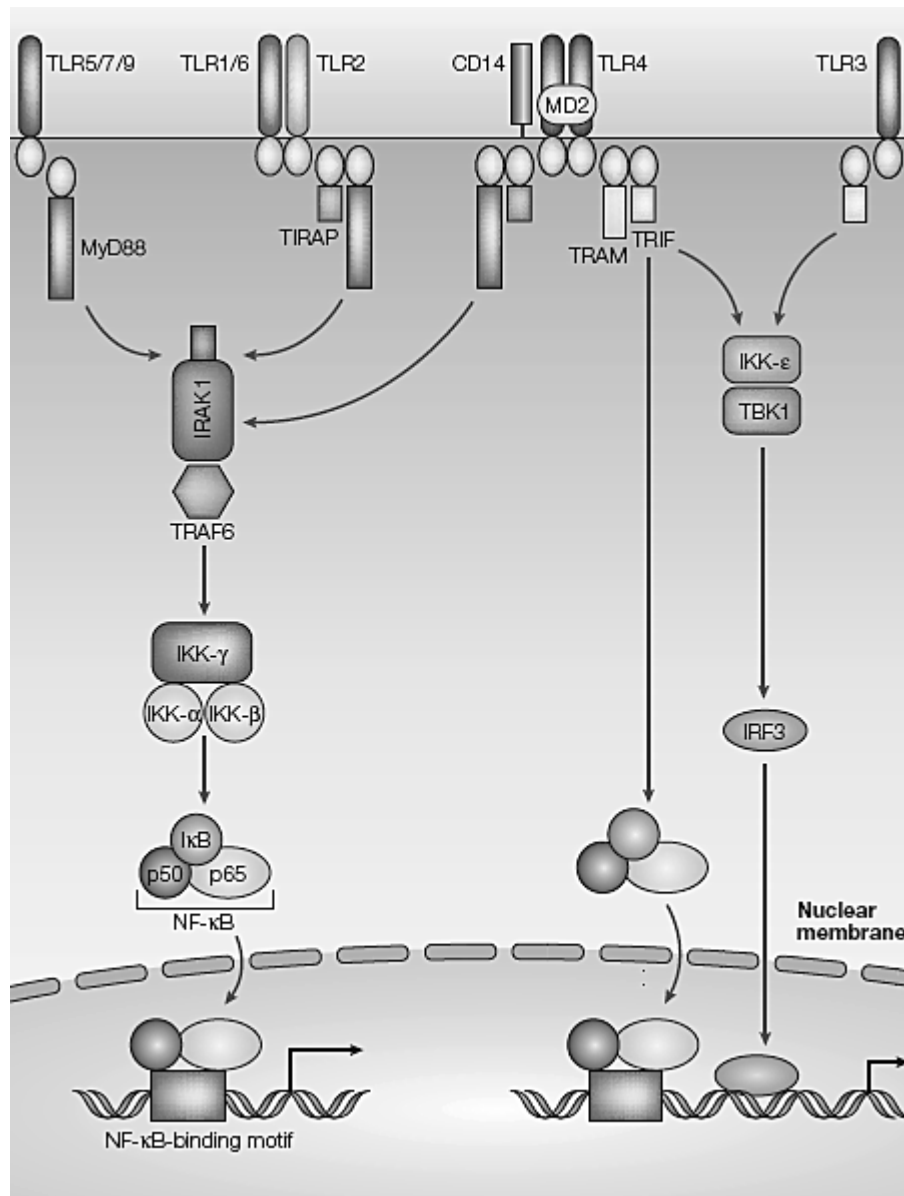


Abb. 4 Vereinfachte Darstellung der TLR Signalwege Die TLR 1-9, mit Ausnahme des TLR 3, induzieren die MyD88 (Myeloider Differenzierungsmarker 88) abhängige Signalkaskade, die über IRAK (Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinasen) und TRAF6 (TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6) den Abbau des NF $\kappa$ B (engl. Nuclear Faktor  $\kappa$ B) Inhibitors I $\kappa$ B initialisieren, was die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern zur Folge hat und die Transkription einer Reihe immunregulatorischer Gene in Gang setzt. TLR 3 und TLR 4 aktivieren TRIF (engl. TIR Domain containing adaptor inducing IFN  $\beta$ ) die TIR Domäne dieser TLRs leiten das Signal an eine Gruppe von IKKs (induzierbare I $\kappa$ B Kinasen) weiter, die IRF3 phosphorylieren und somit die Transkription von IFN  $\beta$  induzieren. (Quelle: Akira, S., Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. Jul 4(7), 499-511)

### 1.3.3 Interferone

Interferone (IFN) sind niedermolekulare Proteine und werden zu den Zytokinen gezählt. Es wird zwischen Typ-I IFN und Typ-II IFN unterschieden. Die Typ-I IFN kommen in monomerer Form vor und unterteilen sich in Superfamilien, deren Hauptunterschied ihr Entstehungsort ist. Die wichtigsten Vertreter der Typ-I IFN sind IFN  $\alpha$  und IFN  $\beta$ . Ihre Induktion und Wirkungsweise ist weitgehend aufgeklärt. Die Gruppe der  $\alpha$ -Interferone spaltet sich wiederum in eine Reihe von Subtypen auf, die von unterschiedlichen Genen exprimiert werden. Die IFN  $\alpha$  entstehen größten Teils in Leukozyten und Fibroblasten, während IFN  $\beta$  nur in einer Form vorkommt und von Endothelzellen und Fibroblasten produziert wird. Des Weiteren zählen IFN  $\lambda$  und IFN  $\omega$  zu den Typ-I IFN.

Das IFN  $\gamma$  stellt den einzigen Vertreter der Typ-II Interferone dar, es kommt in zwei leicht von einander abweichenden Formen vor und bildet Dimere. Die Expression von IFN  $\gamma$  erfolgt in T-Lymphozyten und NK-Zellen und wird von immunregulatorischen Zytokinen induziert oder gehemmt (Sen 2001 und Gemsal et al 1997).

#### 1.3.3.1 Interferon induzierte Gene

Wie bereits in Absatz 1.3.2 beschrieben, wird die Expression der Typ-I Interferone zum Beispiel durch die Erkennung von viralen aber auch bakteriellen pathogenen Mustern induziert. Sie werden von den infizierten Zellen sezerniert und wirken über die Adsorption an ihre Rezeptoren, IFNARs oder IFNBRs (IFN  $\alpha$  ( $\beta$ )-Rezeptoren), sowohl parakrin auf benachbarten Zellen, als auch autokrin auf die IFN produzierende Zelle selbst. Die Bindung an den Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die in der Induktion von Interferon induzierbaren Genen (engl. Interferon stimulated genes ISGs) endet, welche die zellulären und die interzellulären Abwehrmechanismen begründen (Der et al 1998).

Unter den ISGs befinden sich ebenfalls die Gene für IFN  $\alpha$  und IFN  $\beta$ , was zu einer Verstärkung der Interferonantwort führt, sowie Zytokine, Proteine für die Haupthistokompatibilitätskomplexe, Transkriptionsfaktoren, Apoptose fördernde Proteine und Hitzeschockproteine aber auch direkt antiviral wirkende Proteine wie

die Proteinkinase PKR, ISG56, Mx2 Protein (Myxovirus resistance 2), Vertreter der GBP (Guanylat bindende Proteine) und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase. Die Wirkung eines Großteils dieser ISGs wird zusätzlich über eine Modifikation erhöht. In der Literatur beschreibt man diese Modifikation als ISGylierung. Hierbei wird das ISG15 (engl. Interferon stimulated gene 15) wie bei der Ubiquitylierung, kovalent an die Ziel-Proteine gebunden. Das ISG15 besitzt eine dem Ubiquitin ähnliche Domäne, und wird über eine Reihe von Enzymen (E1 = Ube1L, E2 = UbcH8 und E3 = Herc5) prozessiert. Die Enzyme E1, E2 und E3 werden ebenfalls durch Typ-I Interferone hochreguliert, was zu einer vermehrten ISGylierung führt und die Interferonantwort verstärkt. Gleichzeitig wird jedoch auch Usp18, die Protease, welche die ISGylierung wieder rückgängig macht, induziert, was neben geringen Halbwertszeiten und mit weiteren negativ wirkenden Regulationsmechanismen zu einer zeitlichen Begrenzung der IFN induzierten Wirkung führt (Randall et al 2006, Dastur et al 2006, Zhao et al 2005 und Sen 2001).

#### 1.3.3.2 JAK-STAT Signalweg

Der JAK-STAT (engl. Janus Kinase-Signal transducer and activator of transcription) Signalweg wird von einer Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert und ist an zellulären Funktionen wie Proliferation, Migration und Differenzierung beteiligt. Des Weiteren wirken JAK-STAT Kaskaden an der Regulation von Immunantwort und Apoptose mit. In Säugetieren aktivieren 50 Zytokine der Hematopoietin Familie eine Gruppe von strukturell und funktionell hoch konservierten Rezeptoren, die das Signal über vier unterschiedliche Janus Kinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) weiterleiten, die wiederum sieben verschiedene STATs phosphorylieren. Diese dimerisieren und bilden mit weiteren Faktoren unterschiedliche transkriptionsverstärkende Komplexe, die nach Translokation in den Zellkern verschiedene Transkriptionsmuster induzieren (Schindler et al 2002 und Rawlings et al 2004). Die Bindung der Typ-I Interferone an ihre Rezeptoren IFNARs oder IFNBRs führt, wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt, zu einer Konformationsänderung und bringt die im Cytosol assoziierten Janus Kinasen JAK1 und TYK2 in räumliche

Nähe zueinander, was zu deren gegenseitiger Phosphorylierung führt. Die Tyrosin-Phosphorylierungen an den JAKs wirken hoch affin auf STAT1 und STAT2 und werden auf diese übertragen. Die phosphorylierten STAT1 und STAT2 bilden Heterodimere und werden in den Zellkern überführt. Sie bilden zusammen mit dem Protein IRF9 den Transkriptionsfaktor ISGF3 (ISG Faktor3) und binden die ISRE (engl. IFN-stimulated response elements) Sequenzen in den Promoter Regionen aller Typ-I ISGs.

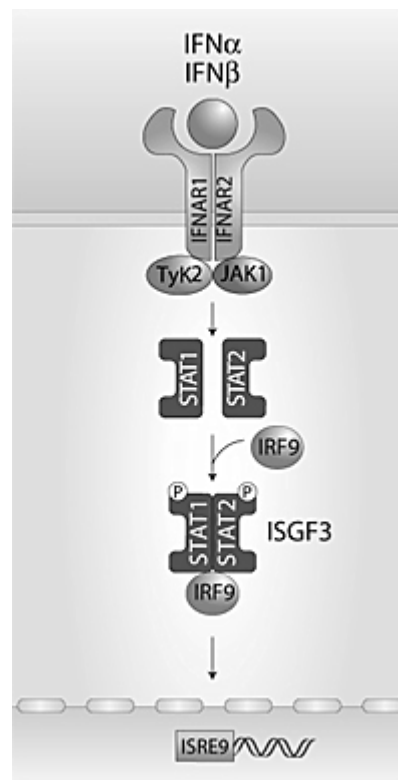


Abb. 5 **Vereinfachte Darstellung des Typ I IFN induzierten JAK-STAT Signalweg** Die Bindung der Typ-I IFN an die Rezeptoren IFNAR1 oder IFNBR2 führt zur Aktivierung der Janus Kinasen JAK1 und TYK2. Diese phosphorylieren STAT1 und STAT2. Sie bilden Heterodimere und binden das IRF9. Dieser Komplex bildet den Transkriptionsfaktor ISGF3 (ISG Faktor3) und bindet nach Translokation in den Zellkern die ISRE (engl. IFN-stimulated response elements) Sequenzen in den Promoter Regionen aller Typ-I ISGs (**Quelle:** Produktbeschreibung von "Interferon α/β Sensor Cells", Bestellnummer # hkb-ifnab invivogen).

Die Wirkung von IFN  $\gamma$  wird durch die Bindung an IFNGR1 und IFNGR2 initialisiert und führt zur Aktivierung von JAK1 und JAK2, oder aber auch von MAP Kinasen, die wiederum STAT1 an Tyrosin- oder Serin-Reste phosphorylieren. Diese Phosphorylierungen führen zur Bildung von STAT1

Homodimeren, die nach Translokation in den Zellkern die Aktivierung von Promotern mit GAS Elementen induzieren (GAS: gamma assoziierte Sequenz). Zusätzlich können die STAT1 Homodimere durch die Bindung des IRF9 ISR Elemente aktivieren. Einige IFNAR sind mit zusätzlichen Kinasen wie ERKs (engl. Extracellular response kinases) assoziiert, sie leiten das Signal über die Phosphorylierung eines Serinrestes an STAT1 weiter, dies führt zur Entstehung von STAT1-Homodimeren und aktiviert ebenfalls die GAS Elemente.

Interferone bewirken über die Phosphorylierungs-Kaskaden der JAK-STAT-Signalwege eine sehr schnelle und direkte Expression der ISGs. Sie induzieren eine sich selbst verstärkende Interferonantwort, die wiederum, durch geringe Halbwertszeiten der mRNAs und negativ regulierende Mechanismen auf Proteinebene sowie die Dephosphorylierungen und den Abbau der STATs, zeitlich begrenzt ist (Sen 2001, Schindler 2002 und Rawlings et al 2004).

#### 1.3.3.3 Einsatz von Interferonen zur Therapie von HCV

Aufgrund der Eigenschaften der Interferone und der Möglichkeit, eine Vielzahl zellulärer Abwehrmechanismen zu induzieren und die körpereigene Immunantwort zu unterstützen, werden Interferone zur Therapie von Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen verwendet, wobei der Nutzen gegen die Schwere der Nebenwirkungen abgewägt werden muss. Eingesetzt werden zum Beispiel rekombinant hergestellte Interferone bei der Infektion mit Papillomaviren und bei Hepatitis B und C Virus Infektionen (Sen 2001 und Peters et al 2001).

In der HCV Therapie hat sich der Einsatz von pegüliertem Interferon  $\alpha 2a/b$  (pegIFN  $\alpha 2$ ) in Kombination mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin (RBV) etabliert. Das Ansprechen auf die Therapie ist abhängig von dem HCV Genotyp, der Viruslast, dem Alter des Patienten, bereits aufgetretenen Leberschäden und Co-Infektionen. Bei der Infektion mit den Genotypen 2 und 3 ist nach 24 Wochen bei bis zu 80% der Patienten ein anhaltender Virusrückgang zu verzeichnen, während bei Genotyp 1 Infektionen nur ca. 50% der Patienten auf die Therapie ansprechen. Ein anhaltender Rückgang der Viruslast tritt hier, bei einer

körpergewichtsabhängigen RBV Dosierung, nach 48 Wochen auf (Fried et al 2002 und Moreno-Otero et al 2005).

Das Ansprechen auf die Therapie lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Ein frühes Ansprechen des Virus (engl. EVR early viral response) in Abhängigkeit vom Genotyp und der eingesetzten Dosis an Medikamenten in der ersten Phase wird gefolgt von einem langsameren aber anhaltenden Rückgang der Viruslast (engl. SVR sustained viral response) in der zweiten Phase. Untersuchungen haben ergeben, dass wenn innerhalb der ersten 12 Wochen nach Therapiebeginn keine EVR mit einem Rückgang der Viruslast um mindestens 2log<sub>10</sub>-Phasen zu verzeichnen ist, kein anhaltendes Ansprechen zu erwarten ist und die Therapie abgebrochen werden kann. Unterschiedliche Expressionsmuster der ISGs sowohl in PBMCs (engl. peripheral blood mononuclear cells) als auch Leberbiopsien von Patienten ermöglichen ebenfalls die Erstellung von Prognosen über ein Ansprechen oder Fehlschlagen der Therapie in den ersten Stunden nach Therapiebeginn und während der Therapie. (Davis et al 2003, Chen et al 2005 und Tripler, Manuskript in Vorbereitung).

Bei Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen oder die erneut einen Virusanstieg verzeichnen, kann alternativ mit anderen Interferonen und antiviralen Substanzen therapiert werden, wobei eine SVR in nur 10-40% der Patienten zu erwarten ist. Diese, bei vielen Patienten ungenügenden Therapieerfolge, verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung weiterer Behandlungsmöglichkeiten gegen HCV (Herrine et al 2005).

## 1.4 Zielsetzung der Versuche

Die Entwicklung von Therapie unterstützenden Behandlungsmaßnahmen bei Hepatitis C Virus Infektionen ist ein wichtiges Aufgabenfeld in der klinischen Forschung. Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von *in vitro* Versuchen, mittels zweier HCV Replicon Systeme, das antivirale Potenzial von in der Therapie gegen HCV einsetzbaren Adjuvazien, wie den Liganden der *toll-like* Rezeptoren oder die Verwendung von siRNA-Technologie (engl. small interfering, siRNA) zum gezielten Ausschalten von Genen, zu untersuchen.

Ein Aspekt dieser Arbeit ist, das in der Literatur bisher wenig verwendete murine HCV Replicon System MH1 zu charakterisieren. Die Interferonsensitivität des Systems als auch der Einfluss weiterer antiviral wirkender Substanzen, wie die Liganden der *toll-like* Rezeptoren, sollen untersucht werden, um den Einsatz der MH1-Zellen in Co-Kultivierungsversuchen mit primär isolierten, nicht-parenchymatösen Leberzellen (NPZ) der Maus, wie den sinusoidalen Endothelzellen und den Kupffer Zellen, zu etablieren. Dieser Versuchsaufbau bietet die Möglichkeit die direkte Beteiligung der NPZ an der lokalen Immunabwehr gegen das Hepatitis C Virus, und somit das antivirale Potenzial den NPZ, aufzuzeigen und zu determinieren.

Des Weiteren führte das Auftreten unterschiedlicher Genexpressionsprofile unter den Interferon induzierbaren Genen bei HCV infizierten Patienten, die auf eine IFN Therapie mit einem Rückgang der Viruslast ansprechen und denen, die nicht ansprechen, zu der Überlegung, einige dieser Gene auf Zellkulturebene in HCV Replicon Systemen auszuschalten und sowohl die direkte Wirkung auf die HCV Replikation, als auch die indirekte Wirkung auf die Induzierbarkeit einer Interferonantwort zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die MH1 und MH2 Zelllinien sind Derivate der murinen Hepatomzelllinie Hepa 1-6 (ATCC Nr. CRL-1830<sup>TM</sup>) und enthalten das subgenomische und bicistronische HCV Replicon I<sub>377</sub>/NS3-3', das auf dem Genotyp 1b Stamm con1 basiert (Genbank Accession No. AJ242652). Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt wurde das Replicon System von Prof. Dr. Christoph Seeger (Institute for Cancer Research, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA) (Zhu et al 2001). Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM High Glucose [4,5 g/l]) kultiviert, das folgende Zusätze enthielt: 10% fötales Kälberserum (FKS), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep). Das Medium für die Replicon enthaltenden Zellen enthielt zusätzlich das Selektionsantibiotikum Geneticin (G418-Sulfat) in der Konzentration von 500 µg/ml Medium. Die Zellen wurden im Brutschrank (HERAcell, Heraeus), bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gespült und mit Trypsin-EDTA überschichtet, nach dem Ablösen der Zellen wurden diese erneut in Kulturmedium aufgenommen und in einer 1:5 Verdünnung erneut in Kultur genommen. Sämtliche Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilwerkbank LaminAir (Modell: LB-72-C, Heraeus) bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 2.1.1 Isolation von Primärzellen aus der Leber

Zur Präparation der nicht-parenchymatösen Leberzellen KC und LSEC wurden 6 bis 10 Wochen alte C57/Bl6 Mäuse verwendet. Die Leber der Tiere wurde nach Tötung durch Genickbruch freigelegt und mittels einer Pumpe (MasterFlex, Cole-Parmer Instrument Company) mit 10 ml eines Ca<sup>2+</sup>-freien Puffers (0,1 mM L-Asparaginsäure, 0,2 mM L-Threonin, 0,3 mM L-Serin, 0,5 mM Glycin, 0,6 mM L-Alanin, 0,9 mM L-Glutaminsäure, 0,9 mM L-Glutamin, 20 mM D(+)-Glukose, 20 mM Fruktose, 197 mM Saccharose, 3 mM Kalziumchlorid (KCl), 0,7 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,5 mM Magnesiumchlorid



(MgCl<sub>2</sub>), 10 mM Hepes und 24 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)) über eine 0,4 mm Kanüle via Pfortader blutfrei perfundiert (4 ml/min) und anschließend mit 10 ml 0,07 mg/ml Liberase Blendzyme3 in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Gey's balanced salt solution (GBSS) gespült (4 ml/min), eine Kollagenase-Lösung, die die Bindegewebsstrukturen verdaut und die Präparation einzelner Zellen ermöglicht. Die Leber wurde anschließend entnommen und in 30 ml GBSS mit 0,07 mg/ml Liberase Blendzyme3 aufgenommen, mechanisch zerkleinert und für 30 min bei 37°C und einer Rotation von 240 rpm (Inkubator innova 400, New Brunswick Scientific) enzymatisch verdaut. Die entstandene Zellsuspension wurde dann über ein Sieb (60 µm Maschenweite, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gegeben um unverdautes Gewebe zu entfernen. Es wurden zusätzliche 130 ml GBSS über die Gewebereste im Sieb gegeben und mit einem Mörser durch das Sieb gepresst. Die Zellsuspension wurde in einem Messbecher aufgefangen. Alle gläsernen Behältnisse, die während der Zellpräparation verwendet wurden, sind zuvor mit Silikon (Silicone Solution) beschichtet, über Nacht getrocknet und autoklaviert worden. Anschließend wurde die Suspension in vier 50 ml Polystyren-Röhrchen überführt und bei 300 rpm für 10 min bei 20°C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde in zwei Waschschritten in GBSS resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Im letzten Waschschriff werden die Zellen in einem Reaktionsgefäß vereinigt und anschließend in GBSS resuspendiert. Von diesem Punkt aus weichen die Protokolle zur Isolation von LSEC und KC voneinander ab.

Die LSEC wurden mittels anti-LSEC-Antikörpern beschichteten MicroBeads (MACS), entsprechend den Angaben des Hersteller-Protokolls, aus der Zellsuspension isoliert. Hierzu wurden die LS-Säulen des MACS-Systems verwendet. Die durch Antikörper vermittelte Isolation der LSEC über den endothelspezifischen Antikörper ME-9F1 (Harder et al 1991) ermöglicht die Präparation einer LSEC Population mit einer Reinheit von  $\geq 95\%$  (Hegenbarth et al 2006 und Diehl et al 2007).

Zur Isolation der KC wurde die Zellen nach dem Waschen in 30 ml GBSS resuspendiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Hierzu wurde OptiPrep bis zu einem Iodixanol Gehalt von 40% mit GBSS verdünnt und davon jeweils 4,25 ml in 15 ml Polystyren Röhrchen vorgelegt. Es wurden 5,75 ml

der Zellsuspension dazugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Suspension mit 0,5 ml GBSS überschichtet, um ein Austrocknen der Zellen während der Zentrifugation zu verhindern. Zentrifugiert wurde der Gradient bei 400 g für 15 min bei 20°C, wobei sowohl die Beschleunigung der Zentrifuge reduziert (von 9 auf 5) und die Bremse deaktiviert wurden. Die entstandene Zellschicht in den Röhrchen wurde herauspipettiert, in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit GBSS aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300g für 10 min und 20°C pelletiert, in zwei weiteren Waschschritten in GBSS aufgenommen und erneut zentrifugiert, um die Gradientenlösung zu entfernen, die die anschließende Elutration behindern würde. Das Pellet wurde dann in 6 ml GBSS aufgenommen, resuspendiert und mittels Elutration wurden die in der Suspension enthaltenden KC isoliert.

Bei der Elutration handelt es sich um einen Zentrifugationsvorgang mit einem gleichzeitig entgegengesetzten, kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom. Die Zentrifugalkräfte der Rotation führen zu einer Sedimentation der Zellen, der Flüssigkeitsstrom wirkt als Zentripetalkraft in entgegengesetzter Richtung. Jede Zelle ordnet sich in der Separationskammer in einer Zone an, in der auf die Zelle ein Gleichgewicht der Kräfte herrscht. Die Zellen trennen sich so nach Größe und Dichte auf und werden durch die spezielle Konstruktion der Separationskammer in einem Fließgleichgewicht gehalten. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums können so relativ homogene Zellfraktionen gewonnen werden.

Der Elutriator (Avanti<sup>TM</sup> centrifuge J-25, Beckmann) wurde entsprechend den Herstelleranweisungen aufgebaut und mit PBS, 75%-igem unvergälltem Ethanol und erneut mit PBS gespült, wobei darauf geachtet werden musste, die Entstehung von Luftblasen im System zu vermeiden. Anschließend wurde GBSS an die Pumpe angeschlossen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 16 ml/min durch den Elutriator gepumpt. Nun wurde die aufzutrennende Zellsuspension über eine 0,9 mm Kanüle in das Schlauchsystem überführt. Anschließen wurden 100 ml des Durchlaufs fraktioniert und die Fließgeschwindigkeit schrittweise auf 23 ml/min, 32 ml/min und schließlich auf 56 ml/min erhöht und jedes Mal wurden ca. 100 ml der durchgelaufenen Flüssigkeit fraktioniert. Die Kupffer-Zellen befanden sich nun in der 56 ml/min-Durchlauf-Fraktion. Die Zellsuspension wurde

anschließend bei 300 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in dem Zellkultur-Medium (DMEM high Glucose mit 10% FKS, 1% L-Glutamin und 1% Pen/Strep) resuspendiert. Die Zellzahlen der KC oder LSEC wurden anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt und  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung einer collagenisierten 6-Lochplatte (Biocoat) in jeweils 3ml Medium ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Heraeus) inkubiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden entfernt, die Zellen einmal mit Medium überspült und erneut in 3ml Medium aufgenommen und bis zur Einführung in den Versuch, wie zuvor beschrieben, inkubiert. Stichprobenartig wurde, mittels FACS Analyse (fluorescence activated cell sorting), die Reinheit der KC und LSEC bestimmt.

### 2.1.2 FACS Analyse

Die Durchflusszytometrie (engl. Flow Cytometry) ist eine Methode zur Charakterisierung und Separierung von Zellen in Suspension anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und der emittierten Lichtstrahlung. Innerhalb einer Messung können relative Zellgröße, relative Granularität oder interne Komplexität sowie die relative Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Die Charakterisierung zellulärer Kompartimente, sowohl auf der Oberfläche als auch im Innern der Zelle, wird durch spezifische fluoreszierende Antikörper ermöglicht.

Die Makrophagenmarker F4/80, CD11b und CD14 wurden zur Charakterisierung der KC verwendet. Antikörper gegen den Endothelzellmarker ME-9F1 wurden zur Identifizierung der LSEC herangezogen.

Für die jeweiligen Oberflächenfärbungen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 96-well Rundbodenplatte (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. In einem Zentrifugationsschritt (5min, 500g und 4°C) wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Schütteln gelöst und in 50µl CellWASH<sup>®</sup> resuspendiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Zellsuspension für 6 min bei 4°C mit 50µl einer *Mouse* IgG-Lösung (0,1mg/ml, gelöst in CellWASH<sup>®</sup>) blockiert. Die Kupffer Zellen wurden anschließend in einem Inkubationsansatz, bestehend aus 5µl F4/80 (APC), 0,1µl CD11b (PerCP-Cy5.5) und 2µl CD14 (FITC) gelöst in 50µl CellWASH<sup>®</sup>, gefärbt.

Die LSEC wurden mit 10µl des anti-LSEC (ME-9F1) Antikörper als auch der gleichen Menge an Isotypkontrolle versehen, in 50µl CellWASH® gelöst und inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 15 min im Dunkeln bei 4°C. Im Anschluß wurden 100µl CellWASH® zu den einzelnen Ansätzen pipettiert und die Zellen in einem erneuten Zentrifugationsschritt (5min, 500g und 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Schütteln vom Boden gelöst und in einem weiteren Waschschrift erneut in 200µl CellWASH® resuspendiert und wie zuvor beschrieben pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 200µl CellWASH® aufgelöst und in ein 5ml Rundbodenröhrchen (BD Falcon, Heidelberg) überführt und mit weiteren 50µl CellWASH® versetzt. Bis zur Messung wurden die Zellen im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Die Messung erfolgte mit einem FACSCalibur® der Firma BD Biosciences (Heidelberg). Die Anregung erfolgte mittels eines Argon Lasers bei einer Wellenlänge von 488nm sowie einer Red Diode bei einer Wellenlänge von 635nm. Gemessen wurden jeweils 100.000 Zellen, zur Auswertung wurde das Programm „Cell Quest Pro“ (BD Biosciences) verwendet.

## 2.2 *in vitro* Stimulationen

### 2.2.1 Erstellen von IFN-Dosiskurven für MH1 und MH2

Nachdem die MH1 und MH2 Zellen in den Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90-100% gewachsen sind, wurden diese durch die Zugabe von Trypsin gelöst und in 10ml Medium aufgenommen. Nach dem Bestimmen der Zellzahl anhand einer Neugebauer Zählkammer wurden  $6 \times 10^4$  Zellen, gelöst in 1 ml Medium, pro Vertiefungen einer 24-Lochplatte ausgesät und über Nacht, wie in Absatz 2.1 beschrieben, inkubiert. Die Interferone IFN  $\alpha$  und IFN  $\gamma$  wurden am nächsten Tag im Zuge eines Mediumwechsels in Konzentration von 0, 25, 250, 500, 1000, und 2500 U/ml Medium auf die Zellen gegeben. IFN  $\beta$  wurde in den Konzentrationen 0, 1, 2,5 10 25 und 50 U/ml Medium eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit den Interferonen inkubiert, die RNA extrahiert und über quantitative RT-PCR die HCV Replikation beobachtet.

### 2.2.1.1 Isolierung von totaler RNA aus Gewebekultur

Zur Extraktion der totalen RNA wurden die Zellen mit 500µl Trizol überschichtet. Die adhärenen Zellen wurden mit einem Plastischaber vom Grund gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,2 ml Chloroform / 1 ml Trizol dazu gegeben und durch Schütteln vermischt. Zentrifugieren bei 12.000 g und 2-8°C für 15 min führte zur Phasentrennung des Phenol-Chloroform-Gemisches. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die gelöste RNA durch die Zugabe von 0,5ml Isopropanol / 1ml Trizol ausgefällt. Das Pellet wurde dann mit 75% Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und abschließend in RNase freiem Wasser gelöst. Im Anschluss wurde die RNA mithilfe des „RNeasy Mini“ Kits (Qiagen) entsprechend den Herstelleranweisungen aufgereinigt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.2 Quantitative *realtime* PCR

Die reverse Transkription von RNA (RT), gefolgt von einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) (RT-PCR), ist eine extrem sensitive Methode, zur Quantifizierung spezifischer mRNAs. In einem *one-step* Verfahren wird durch den Einsatz spezifischer Primer zuerst die mRNA des gesuchten Gens in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche wiederum als Matrize für die folgende PCR dient.

Um eine quantitative Aussage über die eingesetzte Menge an mRNA machen zu können, wurde der *realtime* *Cycler* Rotor-Gene 2000 von Corbett (Mortlake, Australien) verwendet. Über eine Fluorimeter-Komponente erfasst der *realtime* *Cycler* die Fluoreszenz des Fluorophoren nach Bindung an doppelsträngige DNA. Die Auswertung erfolgte über das Programm Rotogene (Version 4.4). Eingesetzt wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen, ein 25 µl-Ansatz wurde wie folgt hergestellt: 5,25 µl H<sub>2</sub>O (RNase frei), 12,5 µl SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,25 µl QuantiTect RT-Mix, 2,5 µl jedes Primers (0.5 mM) und 2 µl Gesamt-RNA (100 ng- 200 ng). Das verwendete *realtime* *Cycler* Programm startete mit einem 30-minütigen RT-Schritt bei 55 °C gefolgt von einer 15-

minütigen Hitzeinaktivierung der RT-Polymerase mit dem Anschluss eines herkömmlichen PCR Schemas, d.h. pro Zyklus 5 sec Denaturierung der dsDNA bei 95°C, 10 sec Primerhybridisierung (55°C) und 30 sec Elongation bei 72°C. Die Produktbildung wurde nach jedem Replikationszyklus über den Fluoreszenzanstieg bestimmt. Nach 40 Replikationszyklen wurden die Schmelzkurven der gebildeten Produkte erfasst, um so die Spezifität der PCR Reaktion zu überprüfen. Aufgrund des Schmelzverhaltens von DNA nimmt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Die maximale Fluoreszenzänderung pro Temperaturerhöhung ergibt ein Maximum in der Schmelzkurve, welches charakteristisch für jedes PCR Produkt ist.

Die vom *realtime Cyler* kalkulierten Kopienzahlen der gemessenen Gene wurden gegen das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin abgeglichen und analysiert. Die verwendeten Primer sind folgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2.1 Primersequenzen, Bestellnummern und Temperatur der Primerhybridisierung der murinen Primer

Gen	Sequenz	Bestellnummer (Qiagen)	Primerhybridisierung
$\beta$ -Aktin	F: AAATCGTGCGTGACATCAAA	---	55°C
	R: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA	---	55°C
HCV 5'UTR	F: GCGGGTTGATCCAAGAAAGG	---	55°C
	R: ATCACTCCCCTGTGAGGAACT	---	55°C
IFI-T1	F: CTGAAATGCCAAGTAGCAAGG	---	55°C
	R: CCAAAGGCACAGACATAAGGA	---	55°C
ISG15	k.A.	QT00322749	55°C
Herc5	k.A.	QT01561364	55°C
IFN $\alpha$	k.A.	QT00327649	55°C
IFN $\beta$	k.A.	QT00249662	55°C
IFN $\gamma$	k.A.	QT01038821	55°C
TLR1	k.A.	QT00157430	55°C
TLR2	k.A.	QT00129752	55°C
TLR3	k.A.	QT00122983	55°C
TLR4	k.A.	QT00259042	55°C
TLR5	k.A.	QT00262549	55°C
TLR6	k.A.	QT01078658	55°C
TLR7	k.A.	QT00251013	55°C
TLR8	k.A.	QT00139111	55°C
TLR9	k.A.	QT01043049	55°C

Die Herstellung der Primer für die Gene  $\beta$ -Aktin, IFI-T1 und HCV wurden bei der Firma Roth in Auftrag gegeben (Sequenzangaben in 5'-3'-Orientierung).

Tabelle 2.2 Primersequenzen und Temperatur der Primerhybridisierung der humanen Primer

Gen	Sequenz	Bestellnummer (Qiagen)	Primerhybridisierung
β-Aktin	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	---	55°C
	R: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	---	55°C
HCV 5'UTR	F: GCGGGTTGATCCAAGAAAGG	---	55°C
	R: ATCACTCCCCTGTGAGGAACT	---	55°C
IFI-T1	F: GCCCAGACTTACCTGGACAA	---	55°C
	R: GGTTTTTCAGGGTCCACTTCA	---	55°C
ISG15	F: TGTCGGTGTCTCAGAGCTGAAG	---	55°C
	R: AGAGGTTCGTCTGCATTTGTC	---	55°C
Herc5	F: ATTTCACTCTCCACCCCAAGA	---	55°C
	R: GCCCAATACTCTTCCAGAACC	---	55°C
Rsad2	F: CAGTGCTTGCATTGCTTTGT	---	55°C
	R: CAAGGTTCCAGCGTGATTTT	---	55°C
G1P3	F: AACCGTTTACTCGCTGCTGT	---	55°C
	R: GCTCTCCGAGCACTTTTTCTT	---	55°C

Die Herstellung der Primer wurden bei der Firma Roth in Auftrag gegeben (Sequenzangaben in 5'-3'-Orientierung).

### 2.2.2 Behandlung von MH1 Zellen mit Agonisten der *toll-like* Rezeptoren

Wie in 2.2.1 beschrieben wurden die MH1 als auch die Hepa1-6 Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät und wie in 2.1 beschrieben über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Agonisten für die TLR 1-9 stimuliert (Pam3CSK4 (1 µg/ml), HKLM (10<sup>8</sup> cells/ml), poly I:C (100 µg/ml), LPS (10 µg/ml), Flagellin (1,5 µg/ml), FSL-1 (1 µg/ml), ssRNA40 (10 µg/ml), Gardiquimod (10 µg/ml), ODN1826 (2 µg/ml)). Zur quantitativen Analyse der Änderungen in der Genexpression wurde die RNA nach 6 Stunden Inkubation isoliert. Für die Beobachtung der Auswirkung auf die HCV Replicon Replikation in den MH1 Zellen betrug die Inkubationszeit 48 Stunden. Für poly I:C (polyinosine-polycytidylic acid), der Ligand des TLR 3, wurde eine dosisabhängige Wirkung (Konzentrationen 0, 50, 100, 250 µg/ml Medium) sowohl auf die Suppression des Replicons als auch auf die Genexpression ausgewählter Gene untersucht.

### 2.2.3 Untersuchung antiviraler Aktivität von KC und LSEC nach der Stimulation mit TLR Agonisten

Zur Untersuchung der TLR vermittelten antiviralen Aktivität der NPZ wurden diese drei Tage nach ihrer Präparation mit den Agonisten der TLR 1-9 in Konzentrationen wie unter 2.2.2 beschrieben für 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände, abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Überstände wurden in einer 1:2 Verdünnung mit Kulturmedium auf die MH1 Zellen, die in einer 24-Lochplatte ausgesät wurden und eine Konfluenz von 30% aufwiesen, gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Als Negativ-Kontrollen wurden sowohl die Überstände von unstimulierten NPZ als auch mit den Agonisten der TLR 3 und -4 versetztes und in gleichen 6-Lochplatten inkubiertes Kulturmedium verwendet. Die Suppression der HCV Replicon Replikation wurde, wie bereits beschrieben (2.2.1.1 und 2.2.1.2), mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

#### 2.2.3.1 Blockierung der antiviralen Wirkung mittels neutralisierender Antikörper

Die NPZ Zellkulturüberstände, die eine TLR induzierte antivirale Aktivität aufwiesen, wurden zur Identifizierung der antiviral wirkenden Zytokine mit neutralisierenden Antikörpern vorinkubiert. Hierzu wurden die NPZ-Überstände 1:10 verdünnt. Diese Verdünnungen wurden dann mit neutralisierenden Antikörpern gegen IFN  $\alpha$  (150 U/ml), IFN  $\beta$  (150 U/ml) und IFN  $\gamma$  (2  $\mu$ g/ml) für zwei Stunden bei 37°C im Inkubator vorinkubiert und anschließend auf 30% konfluente MH1 Zellen gegeben und für weitere 48 Stunden in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA extrahiert und der HCV RNA Gehalt mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.



### 2.2.3.2 Toleranzinduktion durch Vorstimulation der NPZ mit IL-10 und TGF $\beta$

Nicht-parenchymatöse Zellen der Leber, wie KC und LSEC stehen in ständigem Kontakt mit im Blut zirkulierenden Pathogenen. Über anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-10 (Interleukin 10) und TGF  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) können die NPZ eine Toleranz gegenüber diesen Pathogenen entwickeln. Durch die Vorstimulation der NPZ mit IL-10 oder TGF  $\beta$  soll eine Induktion des Toleranzzustandes erreicht und eine anschließende Stimulation der TLRs untersucht werden. Hierzu wurden die isolierten NPZ drei Tage nach ihrer Präparation für 18 Stunden mit 5 ng/ml IL-10 oder 1 ng/ml TGF  $\beta$  inkubiert. Im Anschluss wurden das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit Medium gewaschen, um die Wirkstoffe von den Zellen zu spülen. Dann wurde für 6 Stunden und 20 Stunden mit den antiviral wirksamen TLR 3 und TLR 4 Agonisten stimuliert. Die Zellkulturüberstände der 20 Stunden Stimulationsansätze wurden dann, wie zuvor beschrieben, mit den MH1 Zellen für 48 Stunden inkubiert und die Auswirkung auf die Suppression der HCV Replikation mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Aus den 6 Stunden Stimulationsansätzen wurde die totale RNA extrahiert und die Genexpression von IFN  $\beta$  mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

### 2.2.4 Suppression der Genexpression von ISGs mittels siRNA

Die Entdeckung unterschiedlicher Genexpressionsprofile der ISGs bei HCV infizierten Patienten, die auf eine IFN Therapie mit einem Rückgang der Viruslast ansprechen und denen, die nicht ansprechen (Chen et al 2005 und Trippler et al, Manuskript in Vorbereitung), führte zu der Überlegung, einige dieser Gene auf Zellkulturebene im HCV Replicon System auszuschalten und sowohl die direkte Wirkung auf die HCV Replikation, als auch die indirekte Wirkung auf die Induzierbarkeit einer Interferonantwort zu untersuchen. Die Suppression der Genexpression mittels siRNA, auch *Gen-Knockdown* genannt, erfolgt über einen zellulären Mechanismus des Prozessierens. Der Dicer-

Enzymkomplex spaltet Zell untypische dsRNA in 21-23 bp große Oligomere, die so genannten *small interfering RNAs* (siRNA). Die siRNA bildet mit einem Proteinkomplex den *RNA-induced Silencing Complex* (engl. RISC), dieser bindet den *antisense* Strang des siRNA und schneidet die dazu komplementäre mRNA. Die Degradation der mRNA führt zu einer Reduktion der Translation dieser mRNAs und somit zu einem *gene silencing* auf posttranskriptioneller Ebene (Hammond et al 2000).

Ein auf der humanen Hepatomzelllinie HuH-7 basierendes con1 Replicon System als auch die bisher verwendeten MH1 Zellen wurden im 96er Lochplattenformat mit den siRNAs für ausgewählte ISGs (Qiagen) (Tabelle 3) transfiziert. Die Auswirkungen der verminderten Expression der Gene auf die HCV Replikation und auf die Induktion einer Interferonantwort wurden untersucht.

Hierzu wurden in einem reversen Transfektionsansatz zuerst 12,5 ng der siRNAs (5nM), gelöst in 3 µl Suspensionspuffer, in die Vertiefungen der Lochplatte vorpipettiert. In einem parallelen Ansatz wurden jeweils 2,5 ng der siRNAs für ein gleichzeitiges Ausschalten der fünf Gene eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine nicht codogene siRNA eingesetzt. Anschließend wurden pro Ansatz 0,75 µl des Transfektionsreagenz HiPerFect™ (Qiagen) in 24,25 µl serumfreies Kulturmedium überführt, gemischt und zu den vorgelegten siRNAs gegeben. Der Tansfektionsansatz wurde nun 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^4$  Zellen zu den Tansfektionsansätzen gegeben und das Volumen mit Kulturmedium auf 200 µl aufgefüllt und für 12 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde im Anschluss abgenommen und die Zellen für weitere 60 Stunden sowohl mit als auch ohne Interferon α (murines IFN αA [25 U/ml], humanes IFN αAD [25 U/ml]) inkubiert. Die RNA wurde wie bereits beschrieben extrahiert und der Rückgang der Genexpression der ausgeschalteten Gene, die HCV Replikation und die Induktion einer Interferonantwort wurden mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Tabelle 3      verwendete siRNAs

Gen	Bestellnummern (Qiagen)	
	Human	Maus
non silencing control	1022076	1022076
IFI-T1	SI00445879	---
ISG15	SI00072387	SI01007531
Herc5	SI00115374	SI01064679
Rsad2	SI00708463	---
IFI6-16 (G1P3)	SI00423052	---

## 2.3 Nachweis von Proteinen

### 2.3.1 Extraktion von Proteinen

Zur Proteinextraktion wurde der Überstand von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 4°C kaltem Lysepuffer (200 µl pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) überschichtet und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Schaber von der Platte gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Zelllysate aufgetaut und für 6 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand enthielt die nukleären und cytoplasmatischen Proteine. Die Konzentration der Protein-Lösung wurde anhand des BCA D<sub>C</sub>-Protein Assay (BioRad) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### Zusammensetzung des Proteinlysepuffers

Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	0,5 % (v/v)
Deoxycholic Acid	0,25 % (w/v)
Protease Inhibitor Cocktail	1x
Phosphatase Inhibitor	1x

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die eigene Polarität der Proteine durch geladene Aminosäurereste ist unerheblich, da sich Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer befindet, es lagert sich unabhängig von der Aminosäuresequenz an die Proteine. Aufgrund seiner negativen Ladung wandern alle Proteine zur Anode.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 96 °C denaturiert. Die Taschen des Minigels (Invitrogen) wurden mit Laufpuffer gespült und mit den Proben sowie einem Größenstandard (Page ruler, fermentas) beladen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 150 V für 60-70 min im X Cell Sure Lock™ System (Invitrogen) durchgeführt.

#### **Zusammensetzung des SDS Probenpuffers**

Tris HCl	60 mM
SDS	14,4 mM
Glycerol	25 % (v/v)
Bromphenol blau	0,1 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

### 2.3.3 Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrobplot aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Hybond P, Amersham) überführt. Dazu wurden die PVDF-Membran, zwei Filterpapiere und 6 Blotschwämme für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Blot wurden von der Kathode aus zwei Blotschwämme, ein Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran, ein weiteres Filterpapier sowie vier weitere Blotschwämme luftblasenfrei zusammengelegt und in das X Cell II™ Blot Modul eingelegt. Der Transfer fand bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 55 min statt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBST) geschwenkt. Die primären Antikörper zur Detektion ausgesuchter Gene wurden,

entsprechend der in Tabelle 4 dargestellten Verdünnungen, in 5 %iger BSA Lösung (gelöst in TBST) angesetzt und inkubiert.

### Transferpuffer für ein Gel

20 x Transferpuffer 50 ml

Methanol 100 ml

dd H<sub>2</sub>O 850 ml

### TBST Waschlösung

Tris HCl 10 mM

NaCl 150 mM

Tween 20 0,05 % (v/v)

Tabelle 4 Verdünnung und Inkubationszeiten der Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
anti-eIF2 $\alpha$	1 : 100	4°C über Nacht
anti-phospho-eIF2 $\alpha$	1 : 100	4°C über Nacht
anti-HCV NS5A*	1 : 2.000	2 h RT
anti- $\beta$ -Aktin	1 : 5.000	1 h RT
goat anti-mouse	1 : 5.000	1 h RT
goat anti-rabbit	1 : 20.000	1 h RT

\* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Bartschlager

Nach der Antikörperinkubation folgten 4 Waschschritte, in denen die Membranen für jeweils 5 min im Waschpuffer TBST geschwenkt wurden. Daraufhin wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper inkubiert. Anschließend wurden vier weitere Waschschritte durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte über die an den 2. Antikörper gekoppelte Peroxidase, entsprechend der Angaben des Herstellers, ECL Plus Western Blot Detektions System (Amersham). Die Membran wurde luftblasenfrei unter Klarsichtfolie gelegt, die Exposition des Hyperfilms (Amersham) erfolgte für 10 sec bis zu 5 min in einer Filmkassette. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit den Entwickler- und Fixiererlösungen der Firma Adelfo.

Um mehrere Proteine nacheinander auf einer Membran nachweisen zu können, wurden die Membranen von den bereits gebundenen Antikörpern befreit („gestrippt“). Dazu wurden die Membranen mit 10 ml Stripp-Puffer überschichtet und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membranen wurden anschließend mit voll entionisiertem Wasser gespült, kurz in Methanol geschwenkt und erneut 6 x 5 min in TBST gewaschen und erneut für eine Stunde in 5 %-iger Milchlösung blockiert.

**Zusammensetzung des Stripp-Puffers**

Tris HCl ( pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,7 % (v/v)

### 3. Ergebnisse

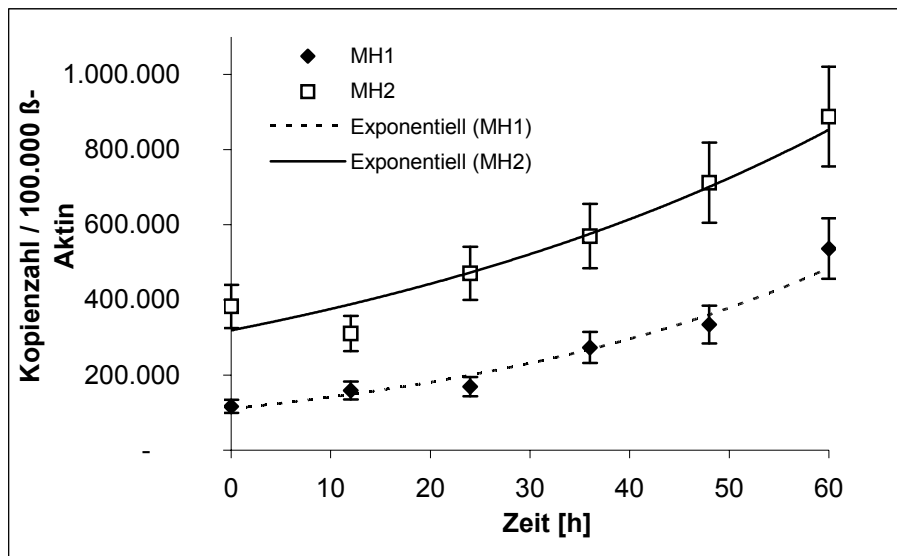
#### 3.1 HCV Replikation in den murinen Replicon Systemen MH1 und MH2

Die Replicon Systeme MH1 und MH2 basieren auf der murinen Hepatomzelllinie Hepa1-6 und enthalten das Replicon Konstrukt I<sub>377</sub>/NS3-3', das auf dem Genotyp 1b Stamm con1 zurückzuführen ist. Bisher wurden ausschließlich die Transfektion dieser Konstrukte sowie die dabei zusätzlich entstandenen adaptiven Mutationen in einzelnen Klonen beschrieben. Der HCV RNA Gehalt erreichte zwar, von Passage zu Passage, unterschiedliche Level, die Replikation wurde allerdings als unabhängig vom Konfluenzstatus der Zellen beschrieben (Zhu et al 2003). Zur weiteren Handhabung des Replicons mussten daher zuerst einmal der Verlauf der viralen Replikation als auch die Interferonsensitivität des Systems bestimmt werden.

##### 3.1.1 Verlauf der Replikation der viralen RNA

Zunächst wurde eine Kinetik der HCV Replikation in den MH1 und MH2 Zellen erstellt. Hierzu wurden jeweils  $6 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefungen einer 24-Lochplatten ausgesät und über einen Zeitraum von 60 Stunden inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde eine RNA Extraktion durchgeführt und der HCV RNA Gehalt mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Der in Abbildung 6 A dargestellte Verlauf der HCV Replikation weist einen stetigen, annähernd exponentiellen Anstieg des HCV RNA Gehalts über den gesamten Zeitraum auf, obwohl die Zellen schon nach 48 Stunden der Inkubation eine Konfluenz von 100% erreicht hatten. Das MH1 Replicon startete mit einer Kopienzahl von 100.000 Kopien / 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und stieg über die 60 Stunden Inkubation um ein 4,6-faches an, während sich die Kopienzahl der HCV RNA in den MH2 Zellen nur um den Faktor 2,3 erhöhte (Abb. 6 B). Der Level an viraler RNA war jedoch in den MH2 Zellen um ein Zweifaches höher als im MH1 System.

A.



B.

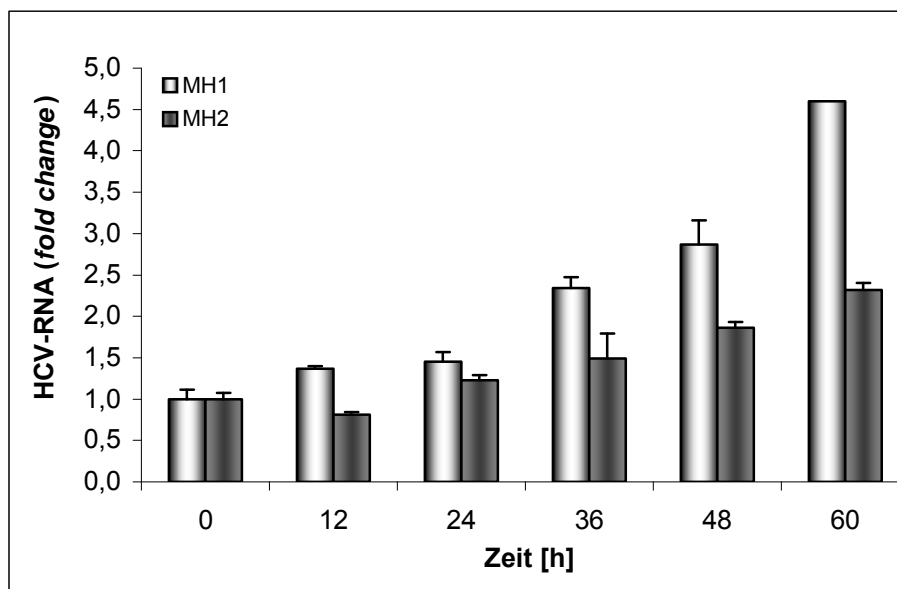


Abb. 6 **Replikation der HCV RNA in den murinen MH1 und MH2 Zellen** Die Zellen wurden 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden nach dem Aussäen in eine 24-Lochplatte geerntet und der Gehalt viraler RNA mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die gemessenen Kopiezahlen wurden gegen das *housekeeping* Gen  $\beta$ -Aktin normalisiert ( $\times$  / 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin). (A) Die virale RNA in den Zellen stieg exponentiell an, wobei die Kopienzahl in den MH2 Zellen doppelt so hoch war, als in den MH1 Zellen. (B) Der Anstieg der HCV RNA (*fold change*) in den MH1 Zellen erfolgte um den Faktor 4,6 und in den MH2 Zellen um ein 2,3-Faches. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of mean*)).



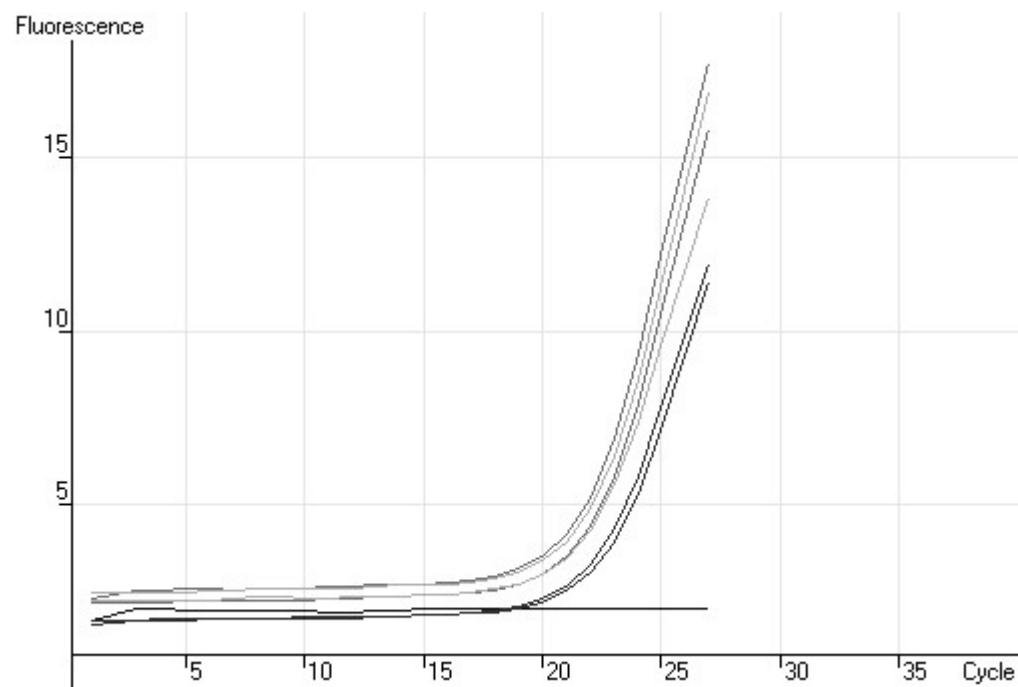
### 3.1.1.1 Exemplarische Darstellung der *realtime* PCR Daten für den Verlauf der HCV Replikation in den MH2 Zellen

Die Amplifikation einer PCR beschreibt drei Phasen. In der ersten Phase ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, nicht optimal. Während es in der letzten Phase durch die Menge der PCR Produkte zur Hemmung der Amplifikation kommt, aufgrund der Hybridisierung von Produktfragmenten, weil Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen an Aktivität verlieren. Eine exponentielle und daher quantifizierbare Amplifikation findet nur in der Phase dazwischen statt. Um am Anfang dieser exponentiellen Phase messen zu können, wird der ct-Wert (threshold cycle = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund Fluoreszenz ansteigt. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der, in die PCR eingesetzten, RNA Menge und dem ct-Wert. Ist die Ausgangsmenge eines Gens bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den ct-Wert konstruiert werden. Die Kopienzahl dieses Gens in einer unbekannten Probe kann über den ct-Wert anhand der Standardkurve bestimmt werden. Zusätzlich erfolgt eine relative Quantifizierung anhand eines Referenzgens (*housekeeping* Gen,  $\beta$ -Aktin), eine interne Kontrolle, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dies wird als Normierung bezeichnet.

Abbildung 7 zeigt die exemplarische Darstellung der *realtime* PCR Daten für den Verlauf der HCV Replikation in den MH2 Zellen. Die Kurvenschar des *housekeeping* Gens zeigt keine signifikante Veränderung (Abb. 7 A). Mit zunehmender Inkubationszeit weisen die Kurven der HCV Messung eine deutliche Verlagerung nach links auf (Abb. 7 B). Die HCV Kopienzahl steigt mit zunehmender Inkubationszeit an. Der Tabelle 5 sind sowohl die entsprechenden ct-Werte als auch die vom Programm anhand der Standardkurve kalkulierten Kopienzahlen zu entnehmen. Zur quantitativen Auswertung wurden diese kalkulierten HCV Kopienzahlen anhand der  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert. Die

Veränderungen der HCV Expression wurden, über den Abgleich mit der versuchsinternen Kontrolle, als *fold changes* angegeben.

A.



B.

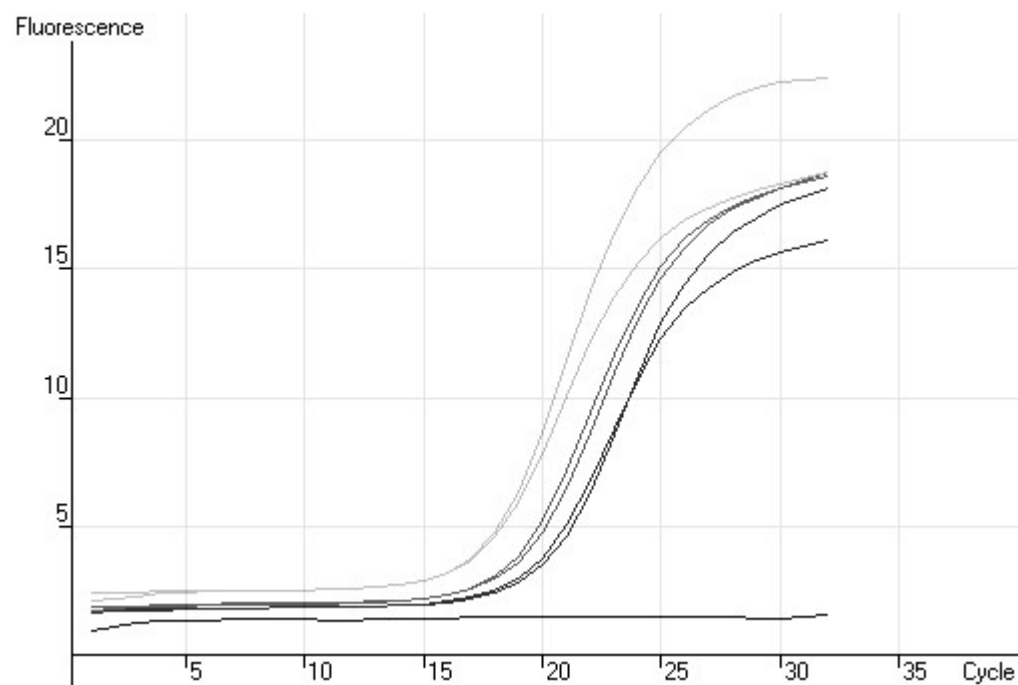


Abb. 7 **Zunahme der Fluoreszenzintensität mit fortschreitendem PCR Zyklus** | Exemplarisch dargestellt sind die Rohdaten der in Tabelle 5 aufgeführten Proben. (A) zeigt die relativ gebündelte Kurvenschar für die  $\beta$ -Aktin Messreihe, in (B) sind die entsprechenden HCV

Messwerte dargestellt. Mit zunehmender Inkubationszeit weisen die Kurven eine deutliche Verlagerung nach links auf. Die HCV Kopienzahl steigt mit zunehmender Inkubationszeit an.

Tabelle 5 exemplarische Darstellung von realtime PCR Daten (Rohdaten) I

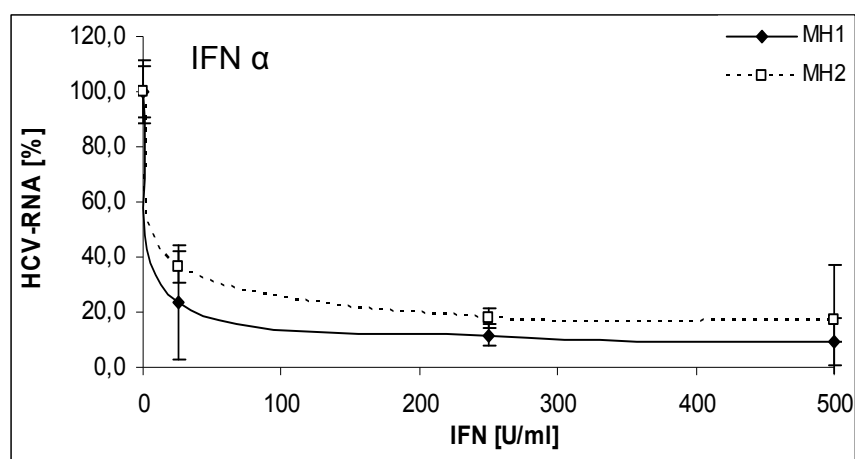
Name	Type	ct	Calc. Conc.
β-Aktin - neg	NTC		
0h	Sample	18,28	88100
0h	Sample	18,82	64800
24h	Sample	18,2	92200
24h	Sample	18,17	93700
60h	Sample	18,21	91600
60h	Sample	18,18	93200
HCV - neg	NTC		
0h	Sample	16,2	286900
0h	Sample	16,21	285300
24h	Sample	15,3	478000
24h	Sample	15,63	397000
60h	Sample	14,36	816000
60h	Sample	14,34	825000

Dargestellt sind das detektierte Gen, der Name der Probe, der Proben Typ, der ct-Wert sowie die anhand einer Standardkurve ermittelte kalkulierte Konzentration.

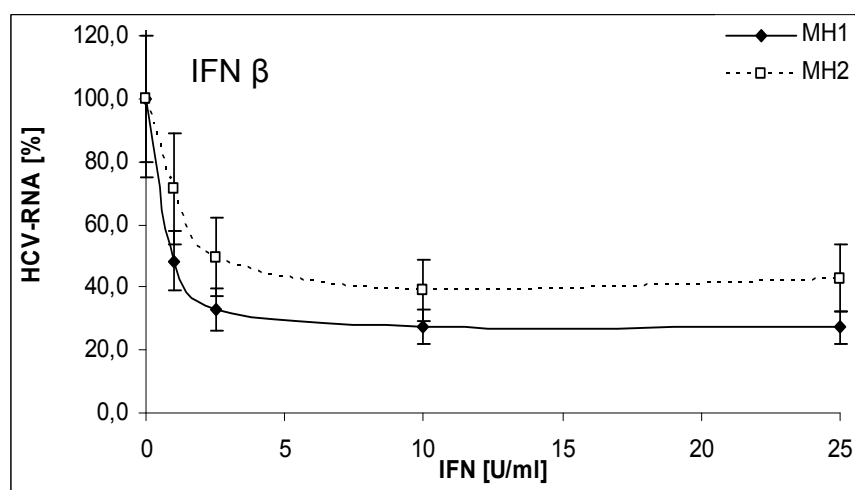
### 3.1.2 Interferonsensitivität des HCV Replicons

Ein dosisabhängiger Rückgang der HCV RNA in MH1 und MH2 Zellen nach der Behandlung mit IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  und IFN  $\gamma$  wurde gezeigt (Abb. 8 A-C). Beide Zellsysteme zeigten eine hohe Sensitivität gegen über IFN  $\beta$  mit  $IC_{50}$ -Werten (maximal inhibitorische Konzentration von 50%) von 1 U/ml für MH1 und 2,5 U/ml bei den MH2 Zellen. Für IFN  $\alpha$  und IFN  $\gamma$  liegen die  $IC_{50}$ -Werte zwischen 10-20 U/ml für beide Replicon Systeme. Die Suppression der Replicon Replikation war bei IFN  $\alpha$  am höchsten mit einem Rückgang um 90% in den MH1 Zellen und 80% in den MH2 Zellen, während IFN  $\beta$  und IFN  $\gamma$  die HCV RNA in den MH1 Zellen um 70% und im MH2- System um 60% reduzierten. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die bereits für ähnliche, humane Replicon System beschrieben wurden, wo die  $IC_{50}$ -Werte, abhängig von den eingesetzten Interferonen, ebenfalls bei 1-10 U/ml lagen (Guo et al 2001, aus dem Siepen et al 2005 und Pietschmann et al 2001).

A.



B.



C.

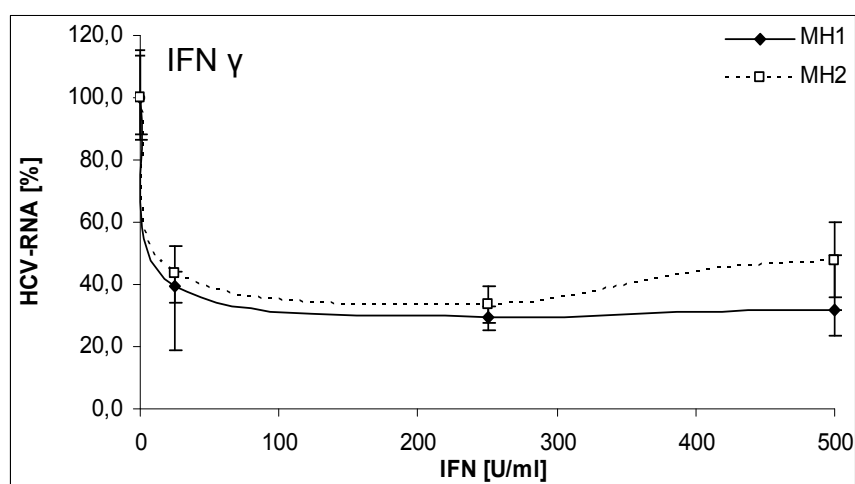


Abb. 8 **Dosisabhängige Suppression der HCV Replikation durch Typ-I und -II IFN**  
 Dargestellt ist der prozentuale Gehalt an HCV RNA ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen die unbehandelten MH1

Kontrolle nach 48 Stunden Inkubation mit unterschiedlichen Dosen an Typ-I und -II IFN (A) Die Suppression der HCV RNA durch IFN  $\alpha$  erreichte bis zu 90%, die  $IC_{50}$  lag für MH1 und MH2 bei 10-20 U/ml. (B) Die Suppression der HCV RNA durch IFN  $\beta$  lag bei 70%, während die  $IC_{50}$  hier für MH1 1 U/ml und MH2 2,5 U/ml betrug. (C) Für IFN  $\gamma$  erreichte die Suppression der HCV RNA Werte 70%, mit einer  $IC_{50}$  von 15-20 U/ml für beide Zelllinien. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM).

### 3.1.2.1 Exemplarische Darstellung der *realtime* PCR Daten für den Rückgang der HCV Replikation unter dem Einfluß von IFN $\alpha$

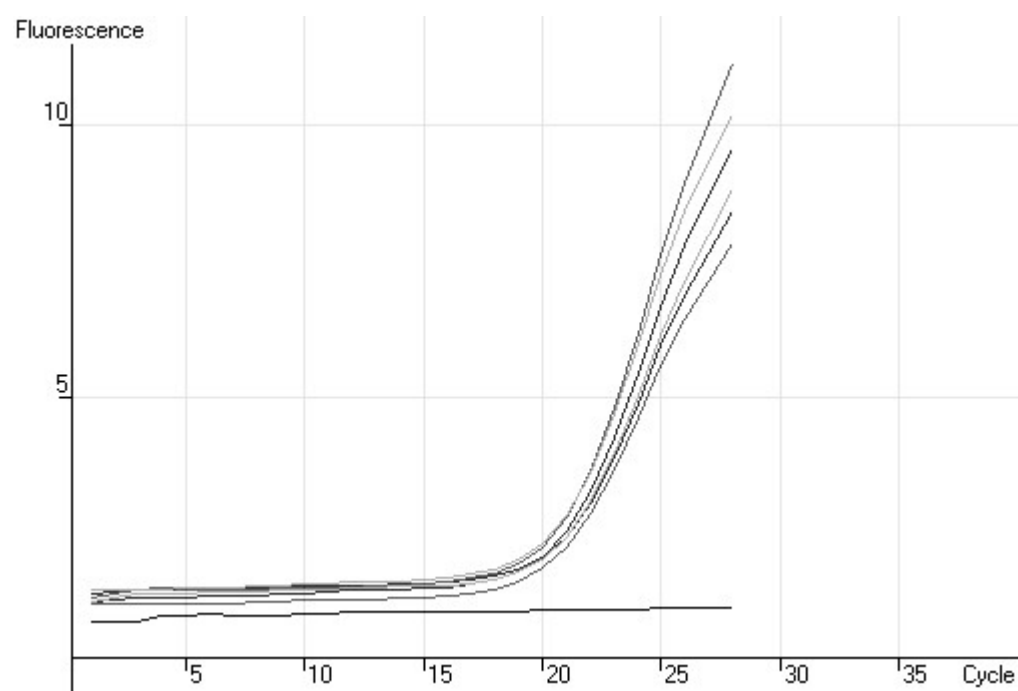
Die Ergebnisse der *realtime* PCR Daten für den Rückgang der HCV Replikation in den MH1 Zellen unter dem Einfluß von IFN  $\alpha$  sind in Abbildung 9 exemplarisch dargestellt. Die Kurvenschar des *housekeeping* Gens zeigt keine signifikante Veränderung (Abb. 9 A). Mit zunehmender Konzentration des eingesetzten IFN  $\alpha$  weisen die Kurven der HCV Messung eine deutliche Verlagerung nach rechts auf (Abb. 9 B). Die HCV Kopienzahl sinkt mit zunehmender IFN  $\alpha$  Konzentration. Der Tabelle 6 sind die entsprechenden ct-Werte sowie die kalkulierten Kopienzahlen zu entnehmen. Zur quantitativen Auswertung wurden die HCV Kopienzahlen noch anhand der  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert. Die Veränderungen der Expressionslevel wurden, über den Abgleich mit der versuchsinternen Kontrolle, als prozentualer Anteil angegeben.

Tabelle 6 exemplarische Darstellung von realtime PCR Daten (Rohdaten) II

Name	Type	ct	Calc. Conc.
$\beta$ -Aktin -neg	NTC		
0U	Sample	17,92	108000
0U	Sample	17,57	131800
25U	Sample	17,07	175100
25U	Sample	17,44	141900
250U	Sample	17,52	135600
250U	Sample	17,78	117000
HCV -neg	NTC		
0U	Sample	15,43	444000
0U	Sample	14,67	684000
25U	Sample	17,31	152800
25U	Sample	16,94	188500
250U	Sample	18,54	76000
250U	Sample	18,94	60500

Dargestellt sind das detektierte Gen, der Name der Probe, der Proben Typ, der ct-Wert sowie die anhand einer Standardkurve ermittelte kalkulierte Konzentration.

A.



B.

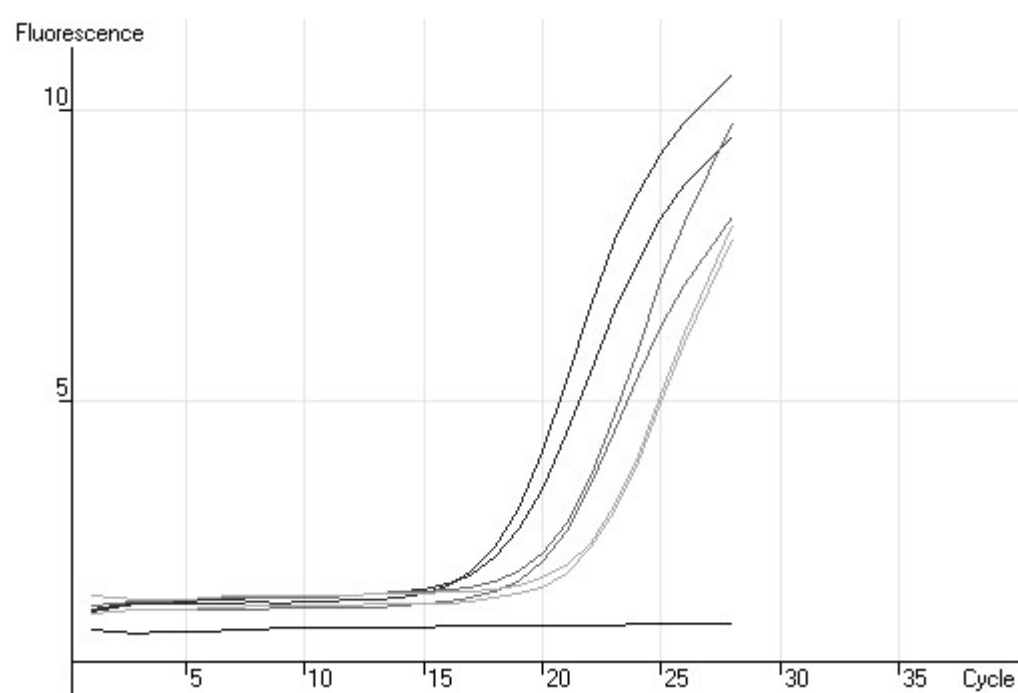
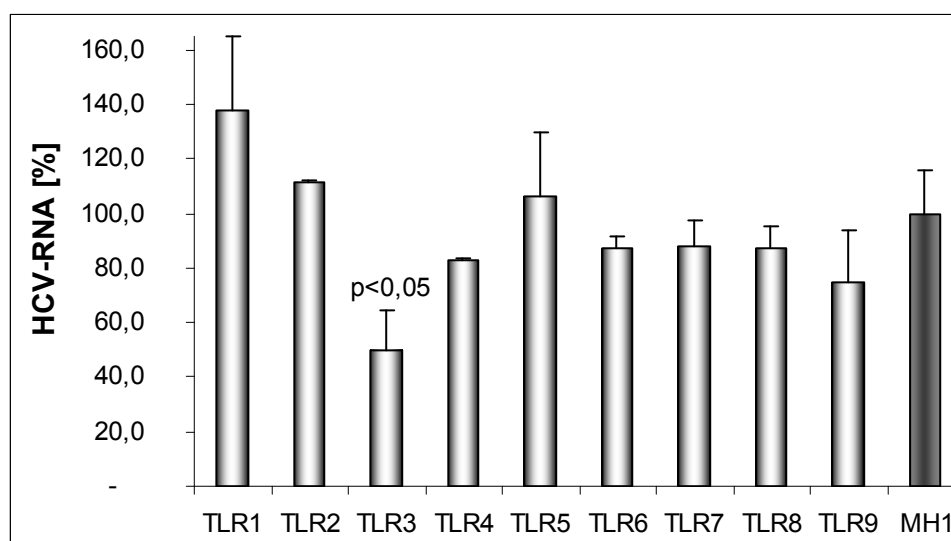


Abb. 9 **Zunahme der Fluoreszenzintensität mit fortschreitendem PCR Zyklus II** Exemplarisch dargestellt sind die Rohdaten der in Tabelle 6 aufgeführten Proben. (A) zeigt die relativ gebündelte Kurvenschar für die  $\beta$ -Aktin Messreihe, in (B) sind die entsprechenden HCV Messwerte dargestellt. Mit steigender IFN  $\alpha$  Konzentration weisen die Kurven eine deutliche Verlagerung nach rechts auf. Die HCV Kopienzahl sinkt mit zunehmender IFN  $\alpha$  Konzentration.

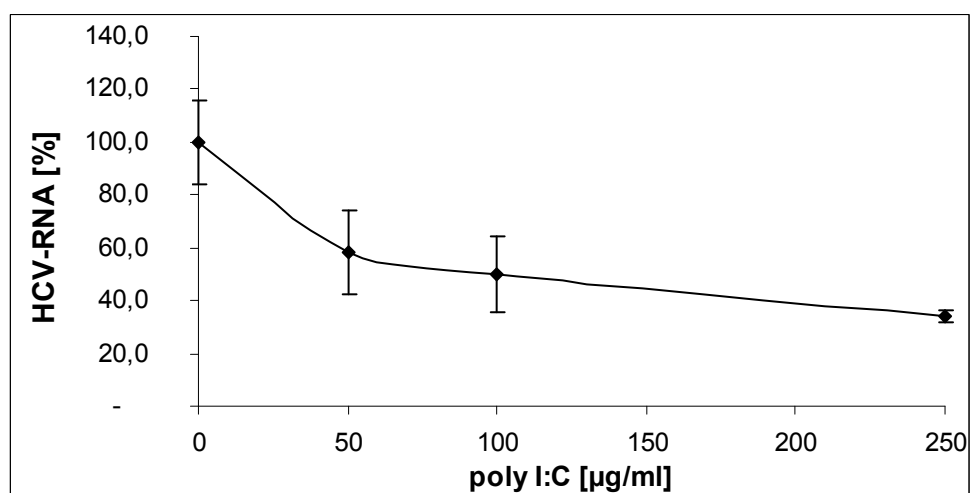
### 3.1.3 Expression und Stimulation der *toll-like* Rezeptoren in MH1 Zellen

Für die anschließenden Versuche wurde das MH1 Replicon verwendet, da es im Vergleich zu den MH2 Zellen sowohl eine höhere Replikationsrate als auch eine größere Sensitivität gegenüber den Typ-I und -II Interferonen aufweist. Um den direkten Einfluss der *toll-like* Rezeptoren auf die HCV Replikation zu untersuchen, wurden die MH1 Zellen für 48 Stunden mit den Agonisten der TLR 1-9 inkubiert. Das Auslösen einer Interferonantwort durch die Stimulation mit den TLR Liganden wurde nach 6 Stunden Inkubation anhand der Expressionsmuster bestimmter ISGs (ISG15, IFI-T1) untersucht. Wie in Abbildung 10 A dargestellt, wurde gezeigt, dass ausschließlich im Fall des TLR 3, eine signifikante Veränderung in der HCV Replicon Replikation induziert werden konnten. In einem weiterführenden Versuch wurde gezeigt, dass der suppressive Effekt des TLR 3 Agonisten poly I:C auf die HCV Replicon Replikation einer Dosisabhängigkeit unterliegt. Der HCV RNA Gehalt konnte durch die 48-stündige Inkubation mit 250 µg/ml poly I:C um 60% gesenkt werden (Abb. 10 B), während 50 µg/ml poly I:C eine 40%ige Suppression der HCV Replikation induzieren. Die Reproduzierbarkeit dieser Daten, sowie das Auftreten sehr geringer Standardabweichungen im Fall der höchsten poly I:C Konzentration (250 µg/ml) sprechen für eine dosisabhängige Wirkung des poly I:C auf die Suppression der HCV Replicon Replikation in den MH1 Zellen. Neben der Suppression der HCV Replikation auf RNA Ebene wurde der poly I:C induzierte Rückgang des subgenomischen HCV Replicons auch anhand des viralen Proteins NS5A mittels Western Blot Analysen gezeigt. Hierzu wurden MH1 Zellen für 9 Tage mit poly I:C haltigem Medium kultiviert (25µg/ml und 150µg/ml poly I:C), als Kontrollen dienten die Zelllysate von unbehandelten MH1 Zellen sowie der parentalen Zelllinie Hepa 1-6 als auch von MH1 Zellen, die für 3, 6 und 9 Tage mit IFN β (100U/ml) behandelt wurden. Wie in Abbildung 10 C dargestellt, konnte für poly I:C ein dosisabhängiger Rückgang des viralen Proteins gezeigt werden. Die Behandlung mit IFN β führte zu einem Rückgang des Proteins unterhalb der Nachweisgrenze.

A.



B.



C.

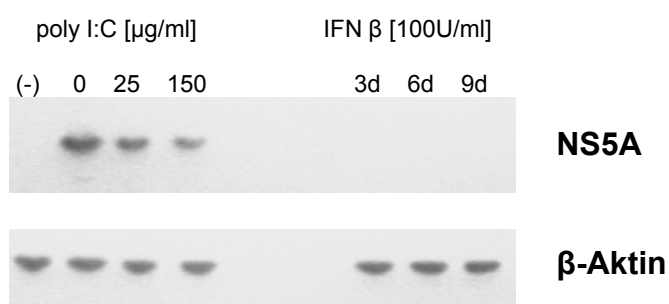


Abb. 10 **TLR Stimulation in MH1** (A) Dargestellt ist der prozentuale Gehalt an HCV RNA, ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen die unbehandelten MH1 Kontrolle. Eine signifikante Veränderung in der HCV Replikation nach einer 48 h Stimulation mit den TLR 1-9 Agonisten wurde ausschließlich für den TLR 3



gezeigt (t-Test  $<0,05$ ). (B) Die poly I:C induzierte Suppression des Replicons unterliegt einer Dosisabhängigkeit. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM). (C) Die dosisabhängige Suppression der HCV Expression durch poly I:C konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden. Die MH1 Zellen wurden für 9 Tage mit poly I:C (25 $\mu$ g/ml und 150 $\mu$ g/ml) behandelt. Als Negativkontrolle wurde ein Zelllysate der parentalen Zelllinie Hepa 1-6 verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden IFN  $\beta$  behandelte MH1 Zellen eingesetzt, die für 3, 6 und 9 Tage mit 100U/ml IFN  $\beta$  behandelt wurden. Über den Nachweis von  $\beta$ -Aktin wurde gezeigt, dass einheitliche Proteinmengen eingesetzt wurden.

Die dosisabhängige Zellantwort der MH1 und Hepa 1-6 Zellen auf die Stimulation mit poly I:C wurde ebenfalls auf Genexpressionsebene gezeigt. Wie in Tabelle 7 dargestellt, induziert poly I:C sowohl in den MH1 als auch in den Hepa 1-6 Zellen eine dosisabhängige Induktion in der ISG15 und IFI-T1 Genexpression.

Tabelle 7      dosisabhängige Geninduktion von ISG15 und IFI-T1 durch poly I:C

poly I:C [ $\mu$ g/ml]	MH1		Hepa1-6	
	ISG15	IFI-T1	ISG15	IFI-T1
0	1.0 $\pm$ 0,10	1.0 $\pm$ 0,24	1.0 $\pm$ 0,04	1.0 $\pm$ 0,14
5	1.5 $\pm$ 0,10	0.8 $\pm$ 0,08	1.7 $\pm$ 0,05	2.0 $\pm$ 0,11
10	2.3 $\pm$ 0,27	1.7 $\pm$ 0,21	1.9 $\pm$ 0,11	3.2 $\pm$ 0,58
50	2.0 $\pm$ 0,42	0.9 $\pm$ 0,09	2.0 $\pm$ 0,11	5.3 $\pm$ 1,07
250	3.3 $\pm$ 0,15	2.7 $\pm$ 0,78	2.4 $\pm$ 0,20	4.1 $\pm$ 0,77
500	4.1 $\pm$ 0,69	2.1 $\pm$ 0,59	2.4 $\pm$ 0,06	4.4 $\pm$ 0,45

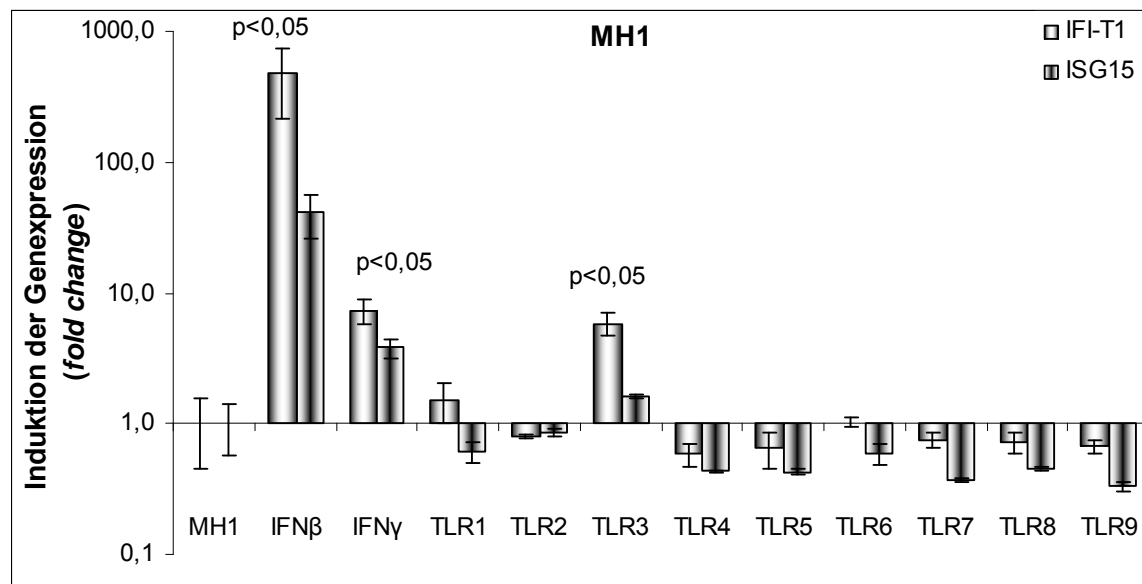
Dargestellt sind die Mittelwerte der poly I:C induzierten *fold changes* ( $\pm$  SEM) für die ISG15 und IFI-T1 Genexpressionen. MH1 und Hepa1-6 Zellen wurden für 6h mit poly I:C behandelt, die Expression von ISG15 und IFI-T1 wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt, gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert und gegen die unbehandelten Kontrolle abgeglichen.

Die Analyse der Genexpressionen von ISG15 und IFI-T1 ergab, dass die Stimulation der MH1 Zellen, sowie deren parentaler Zelllinie Hepa1-6, mit den Agonisten der *toll-like* Rezeptoren 1-9, ausschließlich bei der Stimulation mit dem TLR 3 Liganden poly I:C, eine Interferonantwort auslöst, d.h. eine Induktion der ISG Expression wurde für die Stimulationen mit den restlichen TLRs nicht gezeigt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit IFN  $\beta$  (25 U/ml) und IFN  $\gamma$  (50

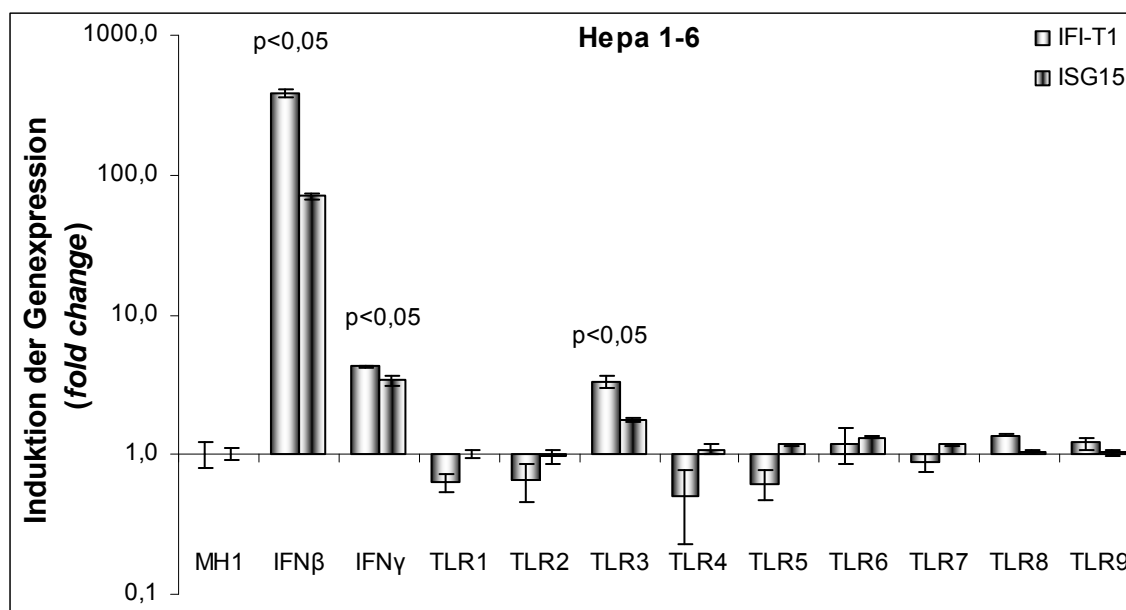
U/ml) stimuliert. Die Abbildungen 11 A und B zeigen, dass die eingesetzten Interferone und auch der eingesetzte TLR 3 Agonist poly I:C einen signifikanten Anstieg der Expression der ISGs zur Folge hatten ( $p$ -Werte  $< 0,05$ ), während die Stimulation der restlichen TLRs zu keiner signifikante Veränderung der Expression der ISGs führte ( $p$ -Werte  $> 0,2$ ).

Im Fall der poly I:C induzierten Suppression des HCV Replicons konnte eine geringe Induktion einer Interferonantwort nachgewiesen werden, was eine Interferon-abhängige antivirale Wirkung vermuten lässt. Die Expression der IFN Gene konnte auf mRNA Ebene nicht nachgewiesen werden. Die Produktion antiviral wirksamer Zytokine konnte in einem weiteren Versuch nicht gezeigt werden. Zellkulturüberstände von poly I:C behandelten MH1 Zellen und Hepa1-6 Zellen wurden nach 20 Stunden Inkubation im Verhältnis 1:2 verdünnt und für weitere 48 Stunden auf unbehandelte MH1 Zellen gegeben, um die Zellkulturüberstände auf eine antivirale Wirkung hin zu untersuchen. Die Zellkulturüberstände hatten keinen suppressiven Effekt auf die HCV Replikation (Abb. 11 C), so dass für poly I:C nur eine direkte Wirkung auf die Replikation der HCV RNA in den MH1 Zellen gezeigt wurde.

A.



B.



C.

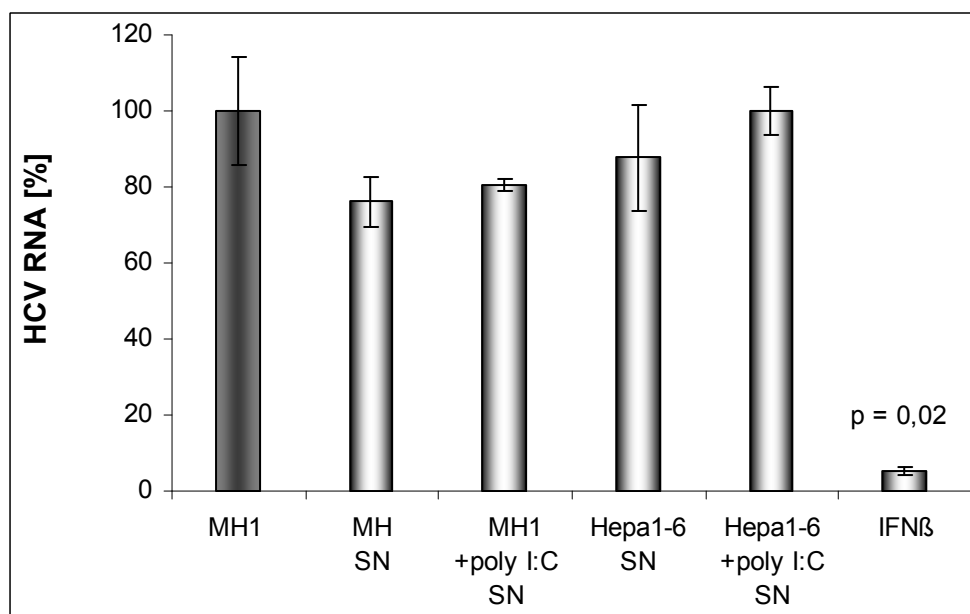


Abb. 11 **Interferonantwort auf Expressionsebene** Dargestellt sind die Induktionen (*fold change*) der ISGs IFI-T1 und ISG15 in den Zelllinien MH1 (A) und Hepa1-6 (B), bestimmt mittels quantitativer RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen die unbehandelte Kontrolle. Nach der Behandlung der Zellen mit Typ-I und -II Interferonen und den Agonisten der TLR 1-9 wurde eine signifikante Induktion der Gene, gegenüber der unbehandelten Kontrolle, ausschließlich für die eingesetzten Interferone sowie für den TLR 3 Agonisten poly I:C gezeigt. (C) Zellkulturüberstände von poly I:C behandelten MH1 Zellen und Hepa1-6 Zellen wurden nach 20 Stunden Inkubation im Verhältnis 1:2 verdünnt und für weitere 48 Stunden auf unbehandelte MH1 Zellen gegeben. Mit Ausnahme der Positivkontrolle (IFN  $\beta$ ) konnte kein

suppressiver Effekt auf die HCV Replikation nachgewiesen werden. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Ein weiterer antiviral wirksamer Signalweg, den poly I:C als dsRNA initiieren kann, ist die Aktivierung der PKR (Protein Kinase R). Die Bindung der PKR an Doppelstrang-RNA hat die Aktivierung durch Dimerisation und Autophosphorylierung zur Folge. Diese Aktivierung führt wiederum zu einer Phosphorylierung des Initiationsfaktors der Proteinbiosynthese (eIF2 $\alpha$ ), wodurch es zu einer Blockierung der Proteinbiosynthese und somit auch der Virusreplikation kommt (Gale et al 1998). Mittels Western Blot Analyse sollte nun die mögliche Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  und die so vermittelte Blockade der Proteinbiosynthese als Ursache für die poly I:C induzierte Suppression der HCV Replikation untersucht werden. Hierzu wurden die MH1 Zellen über einen Zeitraum von 12 Stunden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit poly I:C stimuliert. Nach Ablauf der Zeit wurde eine Proteinextraktion durchgeführt. Wie in Abbildung 12 A dargestellt ist der Faktor eIF2 $\alpha$  über den gesamten Zeitraum nachweisbar, wohingegen die phosphorylierte Form des eIF2 $\alpha$  ausschließlich in der Positivkontrolle zu finden war. Die Abbildungen 12 B und D zeigen die interne Kontrolle  $\beta$ -Aktin und verdeutlichen die Verwendung gleicher Proteinmengen. Die Suppression der HCV Replikation durch die eIF2 $\alpha$  initiierte Blockade der Proteinbiosynthese kann hiermit ausgeschlossen werden.

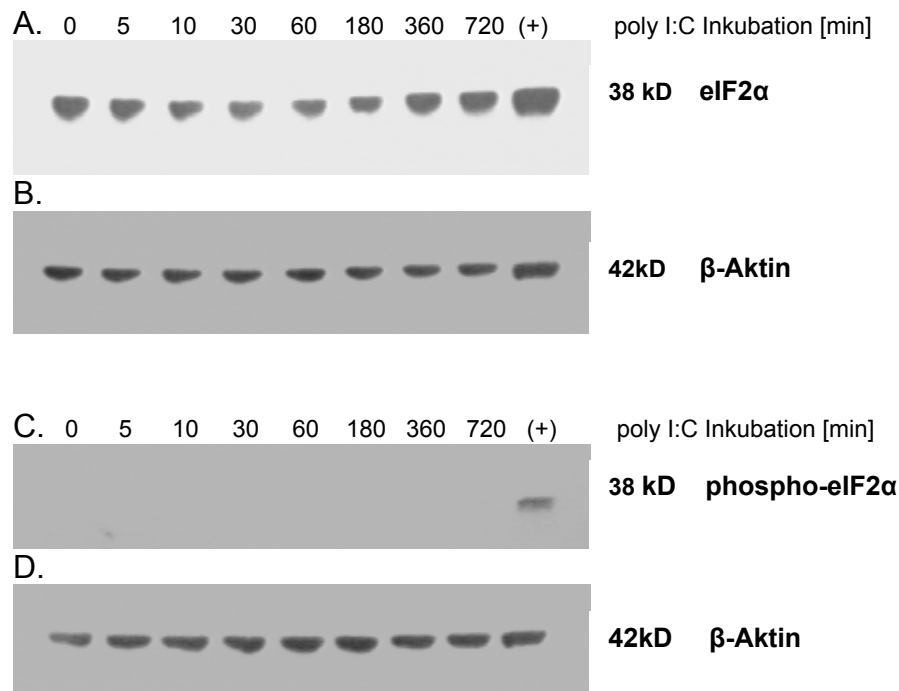


Abb. 12 **Expression und Phosphorylierung von eIF2α** (A) Proteinextrakte von poly I:C behandelten MH1 Zellen so wie die unbehandelte Kontrolle zeigen, über einen Zeitraum von 12 Stunden eine stetige eIF2α Expression. (B) Dargestellt ist das dazugehörige β-Aktin. (C) Phosphoryliertes eIF2α konnte nur in der eingesetzten Positivkontrolle nachgewiesen werden. (D) Dargestellt ist das dazugehörige β-Aktin.

Um das Ausbleiben einer antiviralen Wirkung für den Großteil der TLRs zu untersuchen, wurde die Grundexpression der TLRs in den MH1 Zellen gemessen. Die totale RNA wurde aus unbehandelten MH1 Zellen isoliert und die Expression der TLRs bestimmt. Die ermittelten Kopienzahlen sind in Tabelle 8 aufgeführt, die kalkulierten Kopienzahlen wurden gegen β-Aktin normalisiert ( $\times / 100.000 \beta\text{-Aktin}$ ). Die *toll-like* Rezeptoren 2, 3 und 4 wiesen mit über 10.000 Kopien / 100.000 β-Aktin die höchsten Expressionslevel auf. Die Kopienzahlen für TLR 1, -6 und -7 lagen bei über 500 Kopien / 100.000 β-Aktin. Die Expression des TLR 9 lag nur sehr dicht an der Nachweisgrenze, während TLR 8 nicht detektierbar war. Mit Ausnahme des TLR 5 lagen die Expressionslevel der TLRs in beiden Zelllinien sehr dicht beieinander. Die Kopienzahl des TLR 5 war in den Hepa1-6 Zellen bei über 1.000 Kopien / 100.000 Kopien β-Aktin, während er in den MH1 Zellen nur knapp nachweisbar war.

Tabelle 8 Grundexpression der TLR 1-9 in MH1 und Hepa1-6

Gene	MH1	Hepa1-6
TLR1	1.357,6 ± 23,1	6.771,6 ± 686,4
TLR2	13.527,5 ± 1.305,2	10.309,4 ± 1.048,3
TLR3	15.938,7 ± 1.850,2	15.674,1 ± 757,9
TLR4	60.873 ± 1.865,4	73.617,8 ± 415,9
TLR5	26,3 ± 2,2	3.368,9 ± 217,3
TLR6	4.144,5 ± 131,5	4.551,1 ± 245,7
TLR7	557,9 ± 34,6	347,8 ± 7,9
TLR8	n.d.	n.d.
TLR9	12,2 ± 3,4	52,3 ± 10,3

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kopienzahlen der TLR 1-9 ± SEM, normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin abgeglichen (x / 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin)

n.d. = nicht detektierbar

### 3.2 Suppression der HCV Replikation

Die hohe Sensitivität des murinen, hepatozellulären Replicon Systems gegenüber IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  und IFN  $\gamma$  macht es zu einem sehr nützlichen Werkzeug in der Untersuchung nicht-parenchymatöser Leberzellen wie Kupffer Zellen und sinusoidaler Endothelzellen. KC und LSEC sind im Wesentlichen an der Auslösung inflammatorischer und auch anti-inflammatorischer Reaktionen beteiligt und können direkt mit Hilfe des murinen HCV Replicon Systems auf die Ausschüttung antiviral wirkender Mediatoren untersucht werden. Hierzu wurden die isolierten Primärzellen in Zellkultur genommen, stimuliert und die Überstände im Sinne einer Co-Kultivierung mit den MH1 Zellen inkubiert. Die Suppression der HCV Replikation in den MH1 Zellen verdeutlicht das antivirale Potenzial der NPZ und gibt einen Hinweis auf deren mögliche direkte Beteiligung an der Regulation der HCV Replikation *in vivo*.

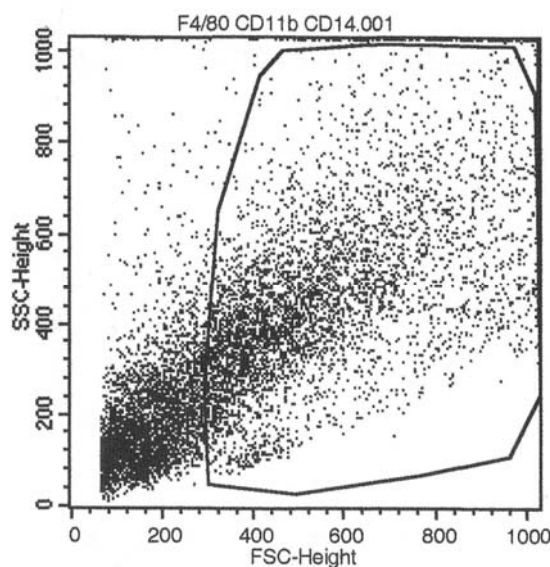
### 3.2.1 Reinheit der Kupffer Zellen und sinusoidalen Endothelzellen der Leber

Zur Charakterisierung der *ex vivo* generierten Kupffer Zellen wurde eine FACS Färbung gegen das Oberflächenantigen F4/80, ein Linienmerkmal für murine Makrophagen, durchgeführt. Von der isolierten Zellpopulation exprimierten mehr als 90 % der Zellen dieses Oberflächenantigen (Abb. 13 A, B). Zusätzlich wurde die Expression der Monocytenmarker CD11b und CD14 auf den Zellen untersucht, wobei die F4/80<sup>+</sup> Zellen ausnahmslos CD11b<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup> waren (Abb. 13 C).

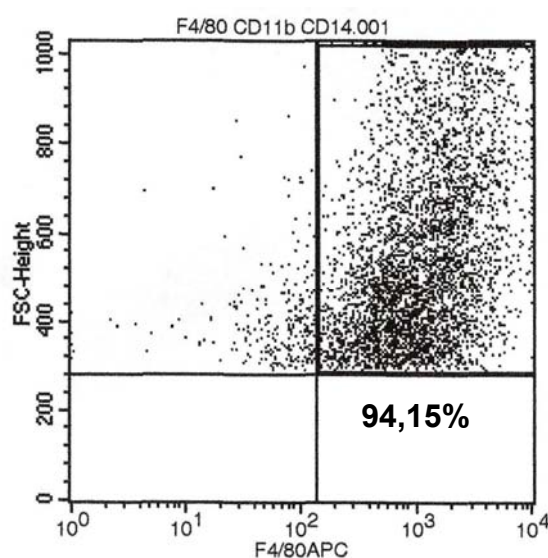
Die *ex vivo* gewonnenen murinen LSEC wurden über die FACS Färbung mit dem Endothel spezifischen Antikörper ME-9F1 sowie der entsprechenden Isotypkontrolle, charakterisiert. Direkt nach der Separation der Zellen mittels magnetischer Sortierung konnte ein Anteil an Endothelzellen von > 85 % gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Durch die anschließende Kultivierung der Zellpopulation wurden die nicht adhärenenten Zellen entfernt. Der Anteil der Endothelzellen konnte, nach drei Tagen Inkubation unter Kulturbedingungen, auf > 90 % erhöht werden (Abb. 14 A-C).

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse zu den nicht parenchymatösen Zellen der Leber beziehen sich, entsprechend der Ergebnisse der FACS Analysen, auf einheitliche Zellpopulationen die im Fall der KC zu > 90 % aus Makrophagen und im Fall der LSEC zu > 90 % aus Endothelzellen bestehen. Diese Reinheitsgrade entsprechen denen, die bereits mit diesen Präparationsmethoden in der Literatur beschrieben sind (Knolle et al 1997 und Diehl et al 2007).

A.



B.



C.

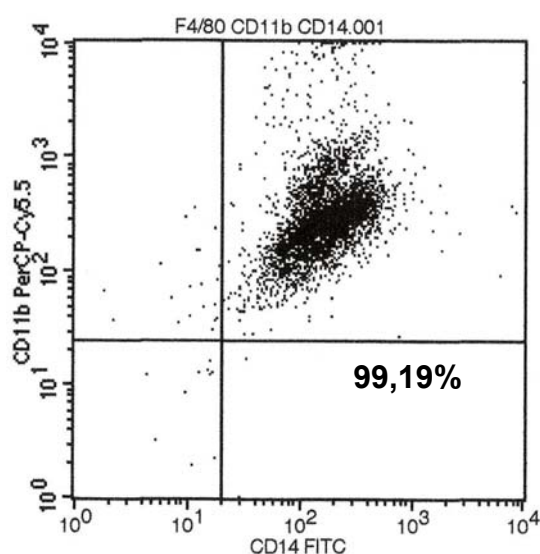
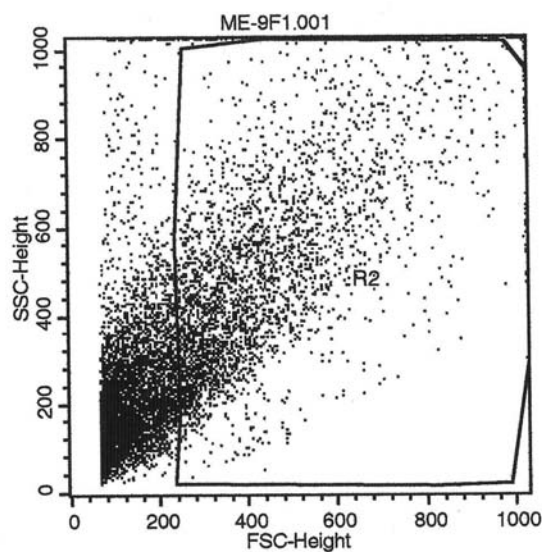


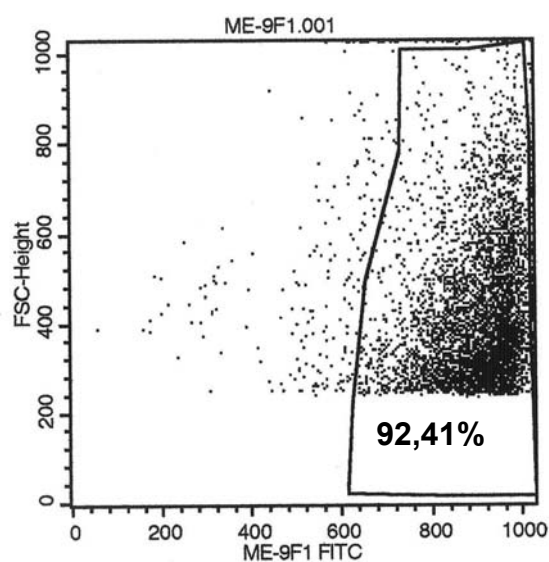
Abb. 12 **Darstellung einer FACS Analyse zur Bestimmung der Reinheit der Kupfer Zellen** (A) zeigt die Auswahl der zur Analyse herangezogenen Zellfraktion, entsprechend des FSC (engl. Forward-scattered light, Maß für die Zellgröße) und SSC (engl. side-scattered light, Maß für die Granularität) Verhaltens der Zellen. Dies führt zum Ausschluss von Zelltrümmern. (B) Die Darstellung der F4/80 Färbung gegenüber der relativen Zellgröße zeigt einen Anteil von 94,15 % F4/80<sup>+</sup> Zellen. (C) Die F4/80<sup>+</sup> Zellen wurden in einer zweiten Auswahl, entsprechend der Signalstärken für die CD11b-Messung und die CD14-Messung, aufgetragen und liefern ein einheitliches, zu 99,19% positives, Ergebnis.



A.



B.



C.

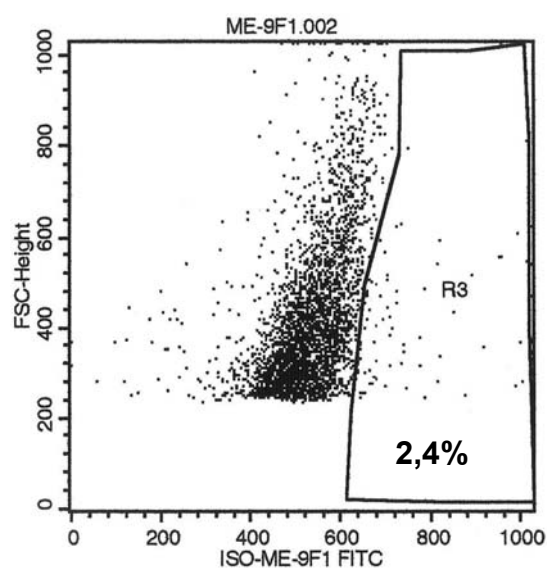
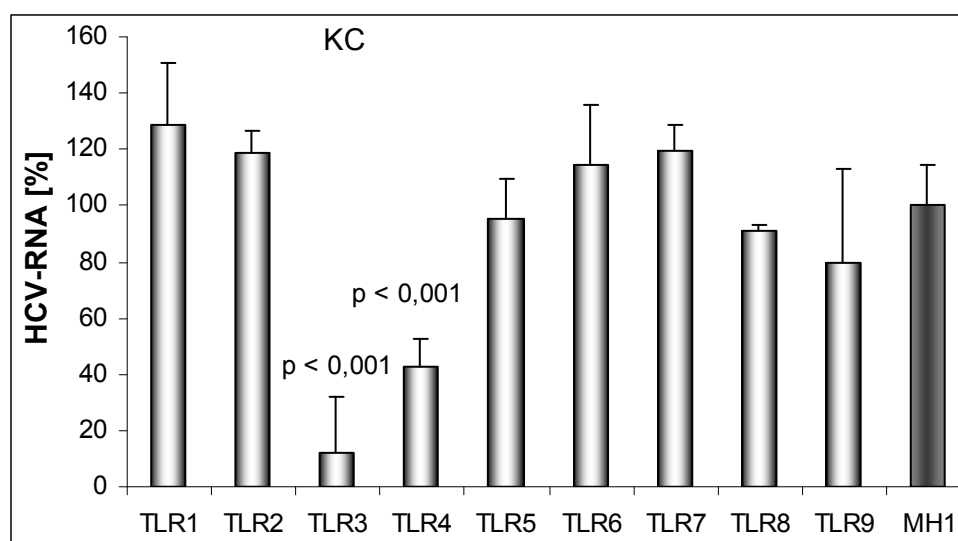


Abb. 13 **Darstellung einer FACS Analyse zur Bestimmung der Reinheit der sinusoidalen Endothelzellen der Leber** (A) zeigt die Auswahl der zur Analyse herangezogenen Zellfraktion, entsprechend des FSC und SSC Verhaltens der Zellen, dies führt zum Ausschluss von Zelltrümmern. (B) Die Darstellung der ME-9F1 Färbung gegenüber der relativen Zellgröße zeigt einen Anteil von 92,41 % ME-9F1<sup>+</sup> Zellen. Die Eingrenzung der Population positiver gefärbter Zellen erfolgte anhand der Isotypkontrolle (C). Das falsch positive Signal durch eine unspezifische Bindung des ME-9F1 Antikörpers liegt bei 2,4 %.

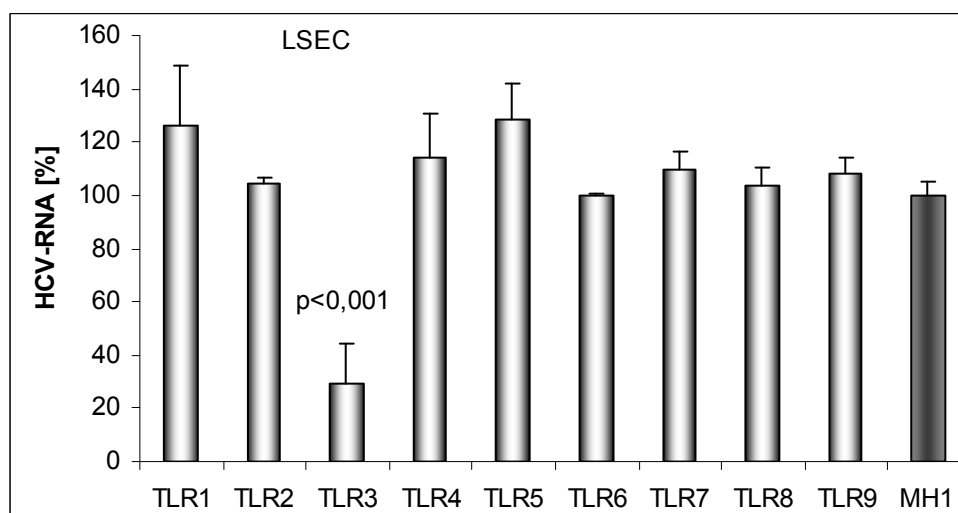
### 3.2.2 Poly I:C und LPS induzieren in KC und LSEC eine antivirale Wirkung

Isolierte KC und LSEC wurden für 20 Stunden mit den Agonisten für die TLR 1-9 stimuliert und die Zellkulturüberstände 1:2 mit dem Kulturmedium der MH1 Zellen verdünnt und mit diesen für 48 Stunden inkubiert. Die totale RNA wurde extrahiert und der HCV Replicon Gehalt mittels *realtime* PCR bestimmt. Wie in Abbildung 15 A dargestellt, wurde in Kupffer Zellen für poly I:C als Agonist des TLR 3 und LPS (Lipopolysaccharide) als Ligand des TLR 4 eine Suppression der HCV Replikation um 60-80% gezeigt. In den sinusoidalen Endothelzellen induzierte nur poly I:C einen antiviralen Effekt mit einer Suppression der HCV Replikation von circa 70% (Abb. 15 B). Die Inkubation der MH1 Zellen mit den Zellkulturüberständen der poly I:C bzw. LPS behandelten NPZ über einen Zeitraum von 9 Tagen führte zu einem Rückgang des viralen Proteins NS5A unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 15 D). Als Kontrollen (Abb. 15 C) wurden die Zellkulturüberstände von unstimulierten NPZ und in Medium gelöstes poly I:C oder LPS verwendet. Die Kontrollen wurden ebenfalls für 20h inkubiert, bevor sie für 48 Stunden auf die MH1 Zellen gegeben wurden. Es konnte keine antivirale Aktivität festgestellt werden. Da poly I:C bei direkter Inkubation eine Suppression der Replicon Replikation in den MH1 Zellen hervorruft (Abb. 10 A), kann hier nur spekuliert werden, dass die dsRNA durch im Serum des Kulturmediums befindliche Nukleasen oder durch Adhäsion an die Oberflächenstruktur der Kulturgefäße reduziert wurde und im Verlauf dieses Versuches keine Suppression der HCV Replikation hervorrufen konnte.

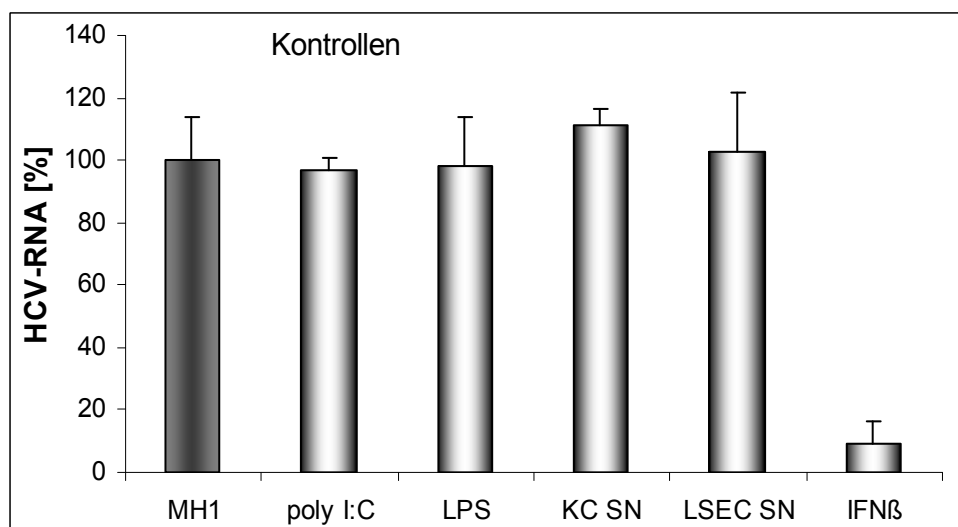
A.



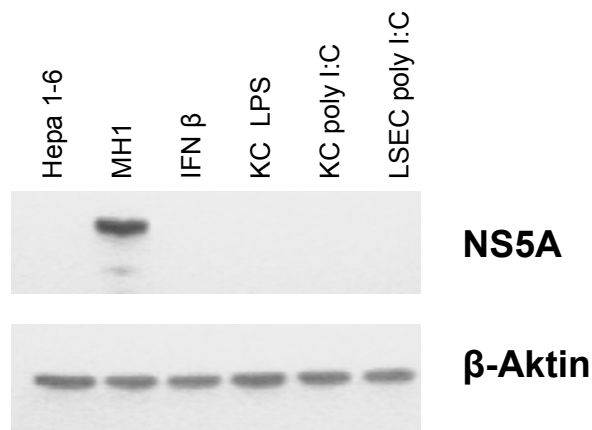
B.



C.



D.



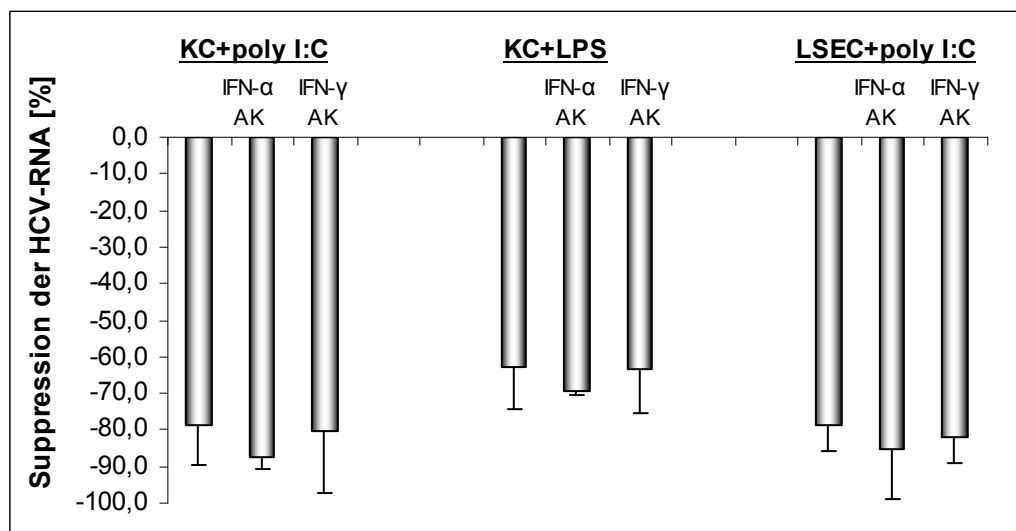
**Abb. 15 Poly I:C und LPS vermittelte Suppression der HCV Replikation in MH1 durch NPZ.** Dargestellt ist der prozentuale Gehalt an HCV RNA ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen unbehandelten MH1 Zellen. Mit TLR 3 und TLR 4 Agonisten behandelte KC (A) sowie TLR 3 stimulierte LSEC (B) induzierten eine hoch signifikante Suppression der HCV Replicon Replikation. Die Stimulation über andere TLRs induzierte keinen direkten Effekt auf das Replicon. Die verwendeten Kontrollen (C) konnten, mit Ausnahme der Positivkontrolle IFN  $\beta$  (10 U/ml), keine Suppression des HCV Gehalts hervorrufen. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM). (D) Die NPZ vermittelte Suppression der HCV Expression konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden. Die MH1 Zellen wurden für 9 Tage mit Zellkulturüberständen von poly I:C und LPS behandelten KC sowie poly I:C behandelten LSEC inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Zelllysats der parentalen Zelllinie Hepa 1-6 verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden IFN  $\beta$  (100U/ml) behandelte MH1 Zellen eingesetzt. Über den Nachweis von  $\beta$ -Aktin wurde gezeigt, dass einheitliche Proteinmengen eingesetzt wurden. Das NS5A Protein war ausschließlich in den unbehandelten MH1 Zellen nachweisbar.

### 3.2.2.1 Blockierung der Wirkung durch neutralisierende Antikörper

Die antiviral wirksamen Zytokine in den Zellkulturüberständen der mit poly I:C und LPS stimulierten NPZ sollten nun über die Blockierung mit neutralisierenden Antikörpern identifiziert werden. Hierzu wurden die KC und LSEC, wie zuvor beschrieben (3.2.1), mit den TLR Liganden stimuliert. Eine 1:10 Verdünnung der Überstände wurde für 2 Stunden mit Blockierungs-Antikörpern gegen IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  oder IFN  $\gamma$  bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Antikörper-behandelten Überstände für 48 Stunden auf die MH1 Zellen gegeben

und die Suppression des HCV Replicons auf RNA Ebene bestimmt (quantitative RT-PCR). Wie in Abbildung 16 A zu sehen, haben die im Überschuss eingesetzten Antikörper gegen IFN  $\alpha$  und IFN  $\gamma$  keinen blockierenden Effekt auf die NPZ induzierte Suppression der HCV Replikation. Der Einsatz der IFN  $\beta$  neutralisierenden Antikörper dagegen konnte den suppressiven Effekt der poly I:C und LPS behandelten NPZ vollständig blockieren (Abb. 16 B).

A.



B.

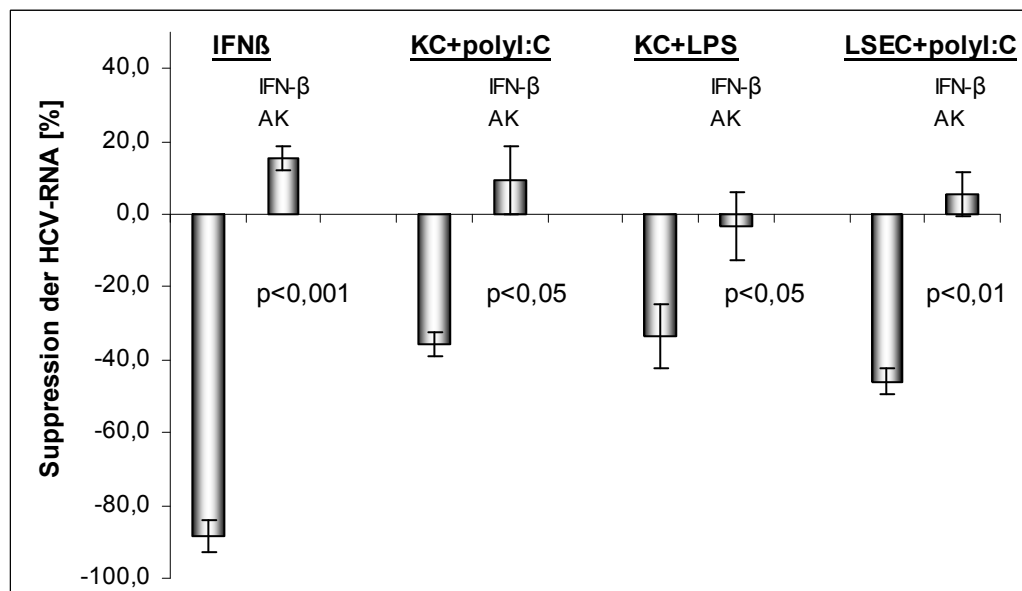


Abb. 16 **Neutralisierende Antikörper gegen IFN  $\beta$  blockieren die poly I:C und LPS vermittelte Suppression der HCV Replikation.** Dargestellt ist die Suppression des HCV Replicons, ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen unbehandelten MH1 Zellen. (A) Mit TLR 3 und TLR 4 Agonisten behandelte

KC sowie TLR 3 stimulierte LSEC induzierten eine hoch signifikante Suppression der HCV Replicon Replikation, die durch IFN  $\alpha$  und IFN  $\gamma$  neutralisierende Antikörper nicht beeinflusst werden konnte. (B) Dieser suppressive Effekt konnte durch den Einsatz IFN  $\beta$  neutralisierender Antikörper vollständig aufgehoben werden. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Die Annahme, dass die TLR 3 und TLR 4 vermittelte Suppression des HCV Replicons durch die NPZ ausschließlich der Ausschüttung von IFN  $\beta$  zu Grunde liegt, wurden von Wu et al ebenfalls, anhand von EMCV und HBV basierenden, Systemen gezeigt. Der antivirale Effekt der poly I:C und LPS behandelten KC und LSEC wurde auch hier durch den Einsatz der IFN  $\beta$  Blockierungs-Antikörper aufgehoben (Wu et al 2007). Die Stimulation der TLR 3 und TLR 4 induzierten in den NPZ einen dosisabhängigen Anstieg der IFN  $\beta$  Expression (Tabelle 9), wobei die Expressionslevel nach LPS Behandlung um ein Hundertfaches niedriger waren als bei der poly I:C Behandlung.

Tabelle 9      dosisabhängige Geninduktion von IFN  $\beta$  nach Stimulation der TLR 3 und TLR 4

<b>poly I:C [<math>\mu</math>g/ml]</b>	<b>KC</b>	<b>LSEC</b>
0	35,6 $\pm$ 0,8	20,9 $\pm$ 2,1
10	184.650 $\pm$ 5.005	150.570 $\pm$ 39.173
50	273.042 $\pm$ 6.216	184.258 $\pm$ 15.742
100	371.002 $\pm$ 59.673	313.467 $\pm$ 126.792

<b>LPS [mg/ml]</b>	<b>KC</b>
0	36,0 $\pm$ 0,8
0,5	1678,2 $\pm$ 353,0
1,0	2506,1 $\pm$ 94,1
5,0	3412,7 $\pm$ 819,0

Dargestellt sind die Mittelwerte der IFN  $\beta$  Kopienzahlen  $\pm$  SEM. Abgeglichen wurden die Werte gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin.

### 3.2.2.2 Einfluss einer Vorinkubation mit IL-10 und TGF $\beta$

Sowohl Kupffer Zellen als auch die sinusoidalen Endothelzellen der Leber sind im Wesentlichen an der Toleranzinduktion gegenüber körperfremden Antigenen beteiligt. IL-10 und TGF  $\beta$  spielen dabei eine entscheidende Rolle. In diesem Versuch sollte getestet werden, ob eine Vorbehandlung mit diesen anti-inflammatorischen Zytokinen eine Veränderung in der poly I:C und LPS induzierten Immunantwort hervorruft. Die isolierten nicht-parenchymatösen Leberzellen wurden vor der Stimulation mit den TLR Agonisten für 18 Stunden mit IL-10 oder TGF  $\beta$  inkubiert. Die antivirale Aktivität wurde, wie zuvor beschrieben, anhand der Co-Kultivierung mit den MH1 Zellen und der Auswirkung auf die HCV Replikation, bestimmt.

Tabelle 10 IL-10 und TGF  $\beta$  haben keinen Einfluss auf die TLR vermittelte antivirale Aktivität in nicht-parenchymatösen Leberzellen *in vitro*

A.	KC SN	LSEC SN
<b>unbehandelt</b>	533.029 $\pm$ 14,27%	969.249 $\pm$ 12,93%
<b>TGF <math>\beta</math></b>	558.178 $\pm$ 6,08%	815.940 $\pm$ 12,49%
<b>IL-10</b>	494.129 $\pm$ 10,94%	1.171.721 $\pm$ 8,61%

B.	poly I:C (KC)	LPS (KC)	poly I:C (LSEC)
<b>unbehandelt</b>	18,3 $\pm$ 6,1	30,9 $\pm$ 2,8	30,7 $\pm$ 6,0
<b>TGF <math>\beta</math></b>	15,9 $\pm$ 5,2	31,3 $\pm$ 6,5	28,2 $\pm$ 5,1
<b>IL-10</b>	19,4 $\pm$ 6,7	31,3 $\pm$ 11,0	19,2 $\pm$ 2,6

(A) IL-10 und TGF  $\beta$  alleine induzieren in NPZ keine signifikante Veränderung in der Zellkulturüberstand vermittelten Modulation der HCV Replikation in den MH1 Zellen (HCV Kopienzahl / 100.000  $\beta$ -Aktin). (B) Die TLR 3 und -4 vermittelte Suppression des HCV Replicons (RNA Gehalt [%]) durch die NPZ wird durch eine IL-10 und TGF  $\beta$  Vorbehandlung nicht beeinflusst.

Wie in Tabelle 10 A verdeutlicht, wurde für eine alleinige IL-10 und TGF  $\beta$  Behandlung in den NPZ keine Veränderung in der Wirksamkeit der Zellkulturüberstände von KC und LSEC gezeigt. Das heißt, die Zellkulturüberstände von KC und LSEC haben auch nach der Stimulation mit IL-10 und TGF  $\beta$  kein antivirales Potenzial. Die unterschiedlichen Kopienzahlen in diesem Versuchen sind auf verschiedene MH1 Passagen zurückzuführen, mit denen die Stimulationen durchgeführt wurden. Es handelt sich nicht um eine NPZ vermittelte Veränderung in der Kopienzahl der HCV RNA. Der zweite Teil der Tabelle 10 (B) zeigt den HCV Gehalt in den behandelten MH1 Zellen, abgeglichen gegen die unbehandelte Kontrolle. Die Vorstimulation der NPZ mit IL-10 oder TGF  $\beta$  hat keine Auswirkungen auf das poly I:C oder LPS induzierte antivirale Potenzial und somit auf die Suppression der HCV Replicon Replikation in den MH1 Zellen. Diese betrug, wie schon in 3.2.1 gezeigt, zwischen 70-80%. Dieses Ergebnis wird durch die Daten der IFN  $\beta$  Expressionsanalyse unterstützt. Wie in Abb. 17 dargestellt, resultiert weder die Vorbehandlung mit IFN  $\alpha$  noch die mit anti-inflammatorisch wirkenden Faktoren TGF  $\beta$  oder IL-10 in einer signifikanten Veränderung der Höhe der durch poly I:C oder LPS induzierten IFN  $\beta$  mRNA Expression in den nicht-parenchymatösen Leberzellen. *In vitro* konnte durch eine IL-10 oder TGF  $\beta$  Vorbehandlung der NPZ keine Toleranz gegenüber der poly I:C und LPS induzierten Immunantwort ausgelöst werden.



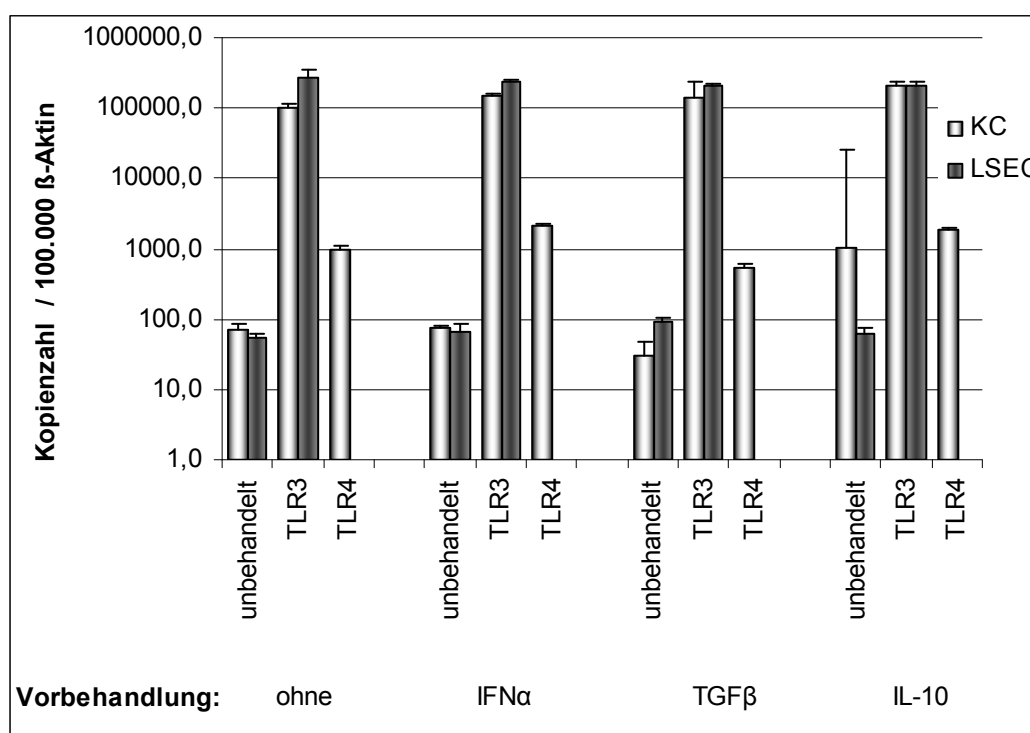


Abb. 17 **TLR vermittelte IFN β Expression in NPZ bleibt von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren unbeeinflusst.** Dargestellt ist die durch TLR 3 und -4 vermittelte IFN β Expression (Kopienzahl / 100.000 Kopien β-Aktin) in KC und TLR 3 vermittelte IFN β Expression in LSEC. Die Vorbehandlungen mit IFN α, TGF β oder IL-10 induzieren keine signifikante Änderung in der IFN β Expression gegenüber der Kontrolle ohne Vorbehandlung. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM).

### 3.3 siRNA vermittelter Gen-Knockdown der ISGs, Effizienz und IFN vermittelte Induzierbarkeit

Für diesen Versuch wurden folgende Vertreter der ISGs ausgewählt: IFI-T1, ISG15, Herc5, Rsad2 und G1P3. Im humanen Replicon System con1 konnten die Expressionen dieser Gene durch den Einsatz von 25 U/ml IFN α um ein Vielfaches hoch reguliert werden. Die Mittelwerte der  $\Delta\text{ct}$  Werte aus den *realtime* PCR Messungen sowie die daraus resultierenden *fold changes* für diese Gene sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Gen Induktionen lagen zwischen 6- und 380-fach und sind vergleichbar mit den Werten aus einer Studie, in der 12 Stunden vor und 12 Stunden nach Therapiebeginn mit pegyliertem IFN α aus dem Blut der

Patienten die PBMCs isoliert und mittels Microarray-Analyse ein Expressionsprofil erstellt wurde (Trippler et al, Manuskript in Vorbereitung).

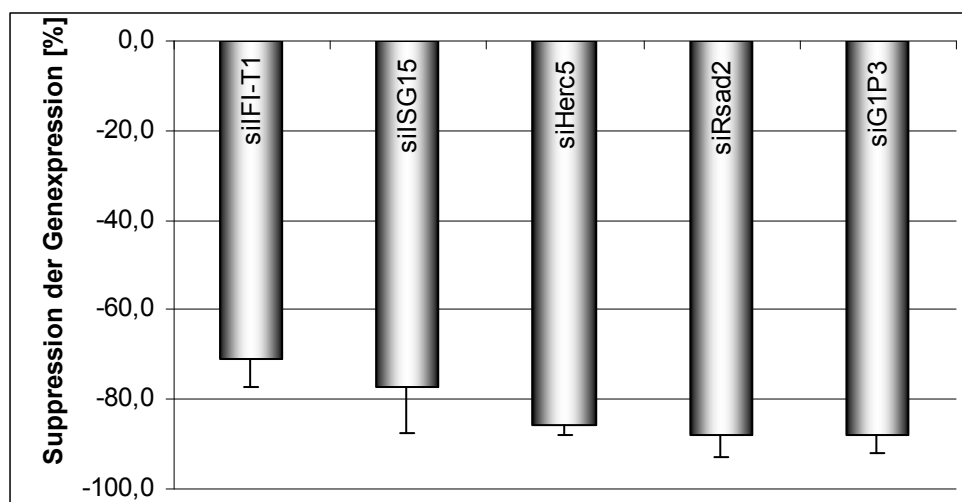
Tabelle 11 IFN  $\alpha$  vermittelte Geninduktion

ISGs	Induktion der Genexpression ( <i>fold change</i> ) $\pm$ SEM	$\Delta$ ct $\pm$ SEM
IFI-T1	51 $\pm$ 23,6	-7,7 $\pm$ 0,3
ISG15	18,4 $\pm$ 4,3	-5,4 $\pm$ 0,1
Herc5	6,0 $\pm$ 0,2	-3,3 $\pm$ 0,3
Rsad2	350,3 $\pm$ 59,6	-10,6 $\pm$ 0,2
G1P3	379,5 $\pm$ 23,0	-11,2 $\pm$ 0,7

In der Tabelle dargestellt sind die *fold changes* der Geninduktion der ausgewählten ISGs 6 Stunden nach Beginn der Inkubation mit 25 U/ml IFN  $\alpha$ , ermittelt nach quantitativer RT-PCR und dem Abgleich gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin (SEM als Fehlerindikator).

Durch das gezielte Ausschalten dieser Gene sollte nun deren direkter Einfluss auf die HCV Replicon Replikation als auch auf die Induktion einer Immunantwort untersucht werden. Die Transfektion der con1 Zellen mit 5 nM der siRNAs resultierte in einer 70-90%-igen Suppression der Genexpression, wie in Abbildung 18 (A) dargestellt. In einem parallelen Ansatz wurden jeweils 1nM der siRNAs für die fünf Gene gleichzeitig eingesetzt, dies resultierte in einer geringeren *Knockdown*-Effizienz, die bei nur 40-80% lag (Abb. 18 B), die Schwankungen in der Effizienz der Suppression der Genexpression ist der Wirkungsweise der einzelnen siRNAs zuzuschreiben, da diese unterschiedliche Optimalbereiche haben, was sowohl die eingesetzte Konzentration als auch die Menge des Transfektionsreagenz betrifft. Der Einsatz einer unspezifisch nicht codogenen siRNA diente als Kontrolle, um das Auftreten von unspezifischen Reaktionen, den so genannten „*off-target*“-Effekten, zu berücksichtigen.

A.



B.

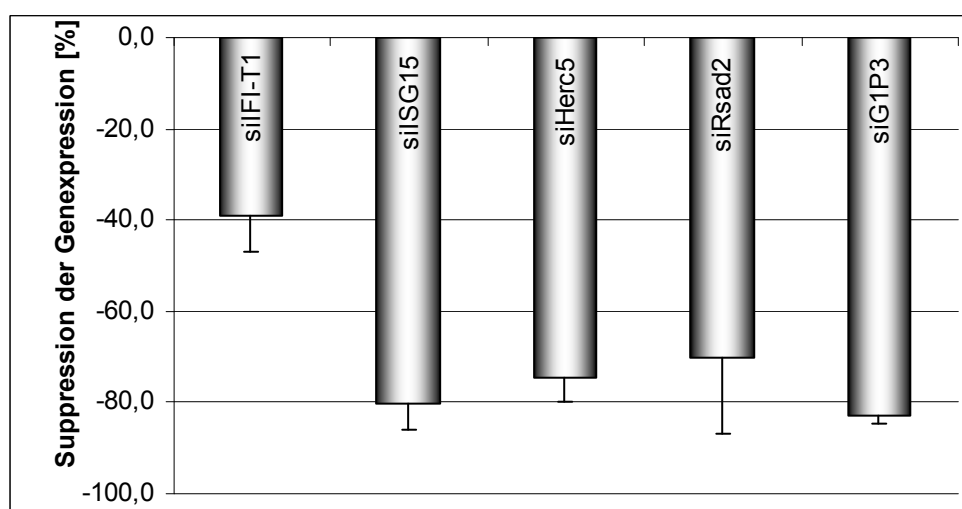


Abb. 18 **siRNA vermittelter Gen-Knockdown der ISGs**. Dargestellt ist die Suppression der Genexpressionen der ISGs ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin und abgeglichen gegen die Negativ-Kontrolle. (A) zeigt die Effizienz der Suppression der Genexpressionen in den Transfektionsansätzen der einzelnen siRNAs. (B) zeigt den gleichzeitigen *Knockdown* der ISGs, mit leicht reduzierter Effizienz, speziell für das Gen IFI-T1 (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM)

### 3.3.1 Gen-Knockdown und die Auswirkungen auf die HCV Replikation und die Interferonantwort

Die Auswirkung der zuvor beschriebenen Suppression der Genexpression der ISGs auf die HCV Replicon Replikation ist in Abbildung 19 dargestellt. Eine

signifikante Veränderung wurde für das Ausschalten des Gens ISG15 gezeigt, das HCV Replicon wurde dabei um 40% reduziert. Dieser suppressive Effekt wurde auch in dem kombinierten siRNA Ansatz erzielt. Durch den Einsatz von IFN  $\alpha$  [25 U/ml] wurde das HCV Replicon in allen Versuchsansätzen auf eine Kopienzahl von ca. 500 Kopien / 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin reduziert, das Ausschalten einzelner oder kombinierter ISGs auf Expressionsebene hatte keinen Effekt auf die durch IFN  $\alpha$  induzierte Suppression der HCV Replicon Replikation.

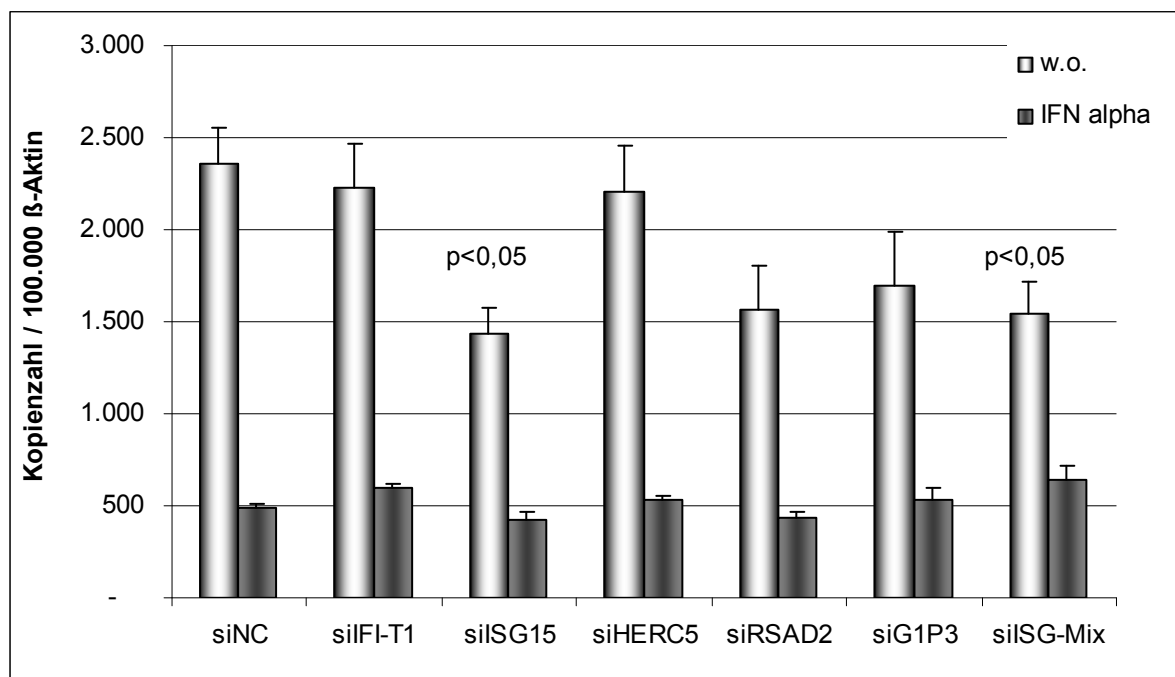


Abb. 19 **Rückgang der HCV Replicon Replikation durch IFN  $\alpha$  während der Suppression der Genexpression der ISGs in den con1 Zellen.** Dargestellt sind die Level der HCV Replicon Replikation sowie die Suppression der HCV Replikation durch IFN  $\alpha$ , ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin. Ein signifikanter Rückgang der HCV Replikation wurde für den Einsatz der siRNA gegen ISG15 gezeigt. Dies gilt auch für den siISG-Mix Ansatz, die Suppression betrug ca. 40%. Die Wirkung von 25 U/ml IFN  $\alpha$  auf das HCV Replicon war in allen Ansätzen ähnlich und erreichte Werte um 500 Kopien / 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Die Induktion einer erhöhten Expression der ISGs durch IFN  $\alpha$  konnte auch in den mit siRNA behandelten Zellen beobachtet werden, wobei die Expressionslevel der ISGs um die *Knockdown* Effizienz von ca. 90% reduziert waren. Tabelle 12 zeigt, dass die Kopienzahlen der ausgeschalteten Gene, 6

Stunden nach Gabe von IFN  $\alpha$ , entsprechend der *Knockdown* Effizienzen (Abb.18) reduziert sind.

Der *Knockdown* der einzelnen und auch der kombinierten Gene durch den Einsatz spezifischer siRNAs führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression der ISGs. Diese Suppression der Genexpression hatte jedoch keine Auswirkung auf die Interferonantwort der Zelle und somit auf den Rückgang der Replicon Replikation (Abb. 19, dunkle Balken). Auch im Falle des Ausschaltens des ISG15 konnte durch die Gabe von IFN  $\alpha$  kein erhöhter Rückgang der Virusreplikation induziert werden. Der *Knockdown* der Genexpression des ISG15 allein ruft eine Suppression der HCV Replikation hervor, die sich allerdings nicht verstärkend auf die IFN induzierte Suppression der HCV Replikation auswirkt.

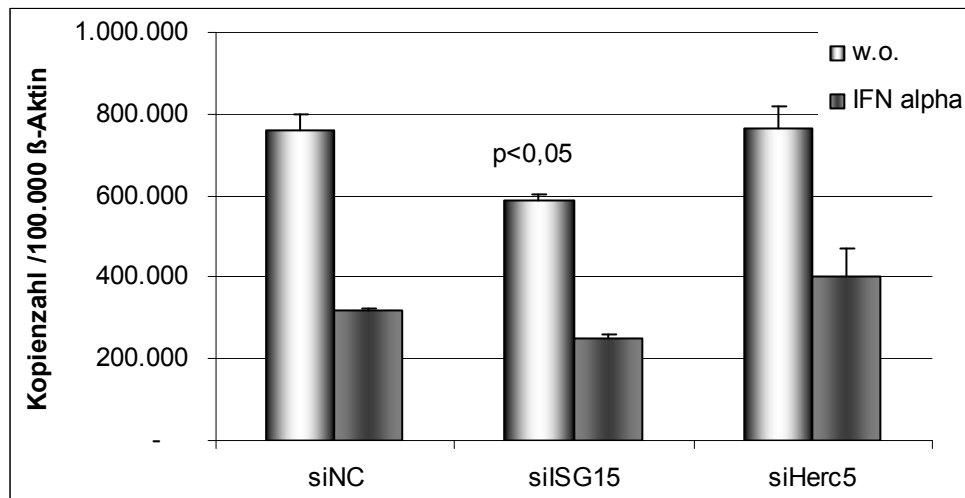
Tabelle 12 IFN  $\alpha$  Behandlung bei Suppression der ISG-Expression mittels siRNA

Gen	siNC + IFN	siRNA + IFN	siISG-Mix + IFN
IFI-T1	701,3 $\pm$ 223	59,5 $\pm$ 1,9	342,7 $\pm$ 71,5
ISG15	436,1 $\pm$ 102	44,8 $\pm$ 10,9	61,5 $\pm$ 14,7
Herc5	626,8 $\pm$ 21	28,4 $\pm$ 2,1	59,2 $\pm$ 7,3
Rsad2	8,32 $\pm$ 1,4	0,56 $\pm$ 0,19	0,39 $\pm$ 0,1
G1P3	132,4 $\pm$ 8,0	8,3 $\pm$ 0,5	16,3 $\pm$ 2,4

Dargestellt sind die Mittelwerte der Kopienzahlen / 100.000  $\beta$ -Aktin  $\pm$  SEM, gemessen nach 6 Stunden Interferon-Stimulation, gezeigt für die Negativ-Kontrolle (siNC), die einzelnen Transfektionsansätze (siRNA) sowie den siISG-Mix Ansatz.

Der suppressive Effekt auf die HCV Replicon Replikation im humanen System, die durch das Ausschalten des Gens ISG15 erzielt wurde, konnte ebenfalls für das murine MH1 Replicon System gezeigt werden. Wie in Abbildung 20 dargestellt, führt der *Knockdown* des ISG15 auch hier zu einer signifikanten, ca. 40 %-igen Suppression des HCV Gehalts ohne eine verstärkende Auswirkung auf die durch IFN  $\alpha$  induzierte Suppression der HCV Replikation aufzuweisen. Die Transfektionseffizienz für dieses System resultierte in einem ca. 60 %-igen Ausschalten der Gene. Schlussfolgernd kann der suppressive Einfluss des ISG15 *Knockdowns* auf die HCV Replikation als nicht-speziesspezifisch beschrieben

werden, da dieser Effekt sowohl für das humane als auch für das murine HCV Replicon System gezeigt wurde.



**Abb. 20 Rückgang der HCV Replicon Replikation durch IFN  $\alpha$  während der Suppression der Genexpression der ISGs in den MH1 Zellen.** Dargestellt sind die Level der HCV Replicon Replikation sowie die Suppression der HCV Replikation durch IFN  $\alpha$ , ermittelt über quantitative RT-PCR, normalisiert gegen 100.000 Kopien  $\beta$ -Aktin. Nach dem Ausschalten des ISG15 durch siRNA, wurde auch für das murine Replicon System MH1 ein signifikanter Rückgang der HCV Replikation gezeigt. Die Wirkung von 25 U/ml IFN  $\alpha$  auf das HCV Replicon wurde durch den Einsatz der siRNAs nicht signifikant beeinflusst. (Der Versuch erfolgte in dreifacher Ausführung, dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM).

## 4. Diskussion

### 4.1 Das MH1 Replicon System

In dieser Arbeit konnte das murine Replicon System MH1 als ein neues Werkzeug in der Erforschung von antiviralen Funktionen etabliert werden. Die hohe Sensitivität gegenüber den Typ-I und Typ-II Interferonen sowie die stabile und vom Zellzyklus unabhängige Replikation des HCV Replicons machen die MH1 Zellen zu einem wertvollen „Readout“ System. Es ermöglicht die Untersuchung direkter als auch indirekter, über das Immunsystem vermittelter, antiviraler Eigenschaften von Therapeutika gegen HCV. Aus der Maus isolierte Primärzellen konnten mit den Repliconzellen co-kultiviert werden und so direkte antivirale Einflüsse auf die HCV Replikation untersucht werden. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Rolle des angeborenen Immunsystems in den nicht parenchymatösen Zellen der Leber und deren TLR vermittelter Kontrolle der HCV Replikation im angrenzenden hepatozellulären Gewebe.

#### 4.1.1 TLR 3 Agonist poly I:C hemmt die HCV Replikation

Die direkte Stimulation der MH1 Zellen mit den Agonisten der TLR 1-9 führte im Fall des TLR 3 Liganden poly I:C zu einer direkten Suppression der HCV Replikation. Das Ausbleiben eines antiviralen Ansprechens im Fall der restlichen TLRs ist größtenteils nicht auf eine fehlende Expression auf Transkriptionsebene zurückzuführen. Wie in Tabelle 8 (Seite 62) aufgeführt, wurde die Expression sämtlicher TLRs, mit Ausnahme des TLR 8, sowohl für die MH1 als auch für die Hepa1-6 Zelllinien, gezeigt. Die Expression auf Proteinebene und die Translokation der Rezeptoren in die Membranen der Zelle wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt. Die Untersuchungen der TLR vermittelte Induktion einer Interferonantwort in den MH1 und Hepa1-6 Zellen wurde ebenfalls auf Genexpressionsebene durchgeführt. Eine Hochregulation der ausgewählten ISGs als Hinweis auf eine Interferonantwort wurde für die eingesetzten Typ-I und Typ-II Interferone und für den TLR 3 Liganden gezeigt. Die Induktion der Genexpression von IFI-T1 und ISG15 in den MH1 und Hepa1-6

Zellen ist nahezu identisch (Abbildungen 11A und B, Seiten 58 und 59). Ein negativ regulierender Einfluss des HCV Replicons auf die TLR Signalwege kann an dieser Stelle für das Ausbleiben einer Immunantwort ausgeschlossen werden. Der antivirale Effekt von poly I:C auf das HCV Replicon wurde als dosisabhängig beschrieben. Für die Zellkulturüberstände der poly I:C behandelten MH1 und Hepa1-6 Zellen konnte jedoch kein suppressiver Effekt nachgewiesen werden, so dass hier eine direkte, durch poly I:C induzierte, antivirale Zellantwort zu beobachten war. Der direkte Einfluss von poly I:C auf HCV Replicons wurde bereits für humane Systeme untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die herkömmlichen HCV replizierenden HuH7-Derivate nicht mit einem Rückgang des Replicons auf die Gabe von poly I:C reagieren. Die naiven HuH7 Zellen wurden als TLR 3-defizient beschrieben und reagieren auf die Gabe von poly I:C mit einer erhöhten Transkription und Translation, jedoch nicht mit der Produktion von IFN  $\beta$ , während nicht-hepatozelluläre HeLa Zellen, die ein dem MH1 Replicon entsprechendes HCV Konstrukt enthalten, sowohl im naiven als auch im infizierten Zustand auf die Gabe von poly I:C mit einer IFN  $\beta$  Ausschüttung reagieren (Guo et al 2003 und Foy et al 2005). Das Ausbleiben einer Antwort auf die poly I:C Stimulation in den HCV replizierenden HuH-7 Zelllinien konnte jedoch nicht genau geklärt werden, da es sich dabei um eine spezifische Eigenschaft der Zellen handeln könnte oder ein durch das Virus induzierter Prozess des Umgehens der zellulären Abwehrmechanismen ist (Guo et al 2003 und Foy et al 2005). Neben dem TLR 3 Signalweg ist RIG-I ein weiteres intrazelluläres Erkennungssystem für dsRNA. Beide Systeme leiten eine IRF-3 Phosphorylierung ein, die zu einer Translokation dieses Faktors in den Zellkern führt und den IFN  $\beta$  Promotor aktiviert. Dieser Schritt kann jedoch durch die Protease Funktion des viralen NS3/4A geblockt werden, so dass der Virus diesen zellulären Abwehrmechanismus umgehen kann (Foy et al 2005, Lanford et al 2003 und Li et al 2005). Li et al (2005) beschrieben die Aminosäuresequenz PPPPPPPSSTPCSAHL im TRIF Protein des TLR 3 Signalweges als mögliche Schnittstelle für die NS3/4A Protease. Sequenzanalysen des humanen (Accession no. BAC44839) und murinen (Accession no. NP 778154) TRIF Proteins zeigten lediglich 55% Sequenzhomologie sowie das Fehlen der möglichen NS3/4A Protease-Schnittstelle im murinen Protein (siehe Anhang,



Seite 105). Diese Beobachtung lässt eine speziesspezifische Funktion der viralen NS3/4A Protease vermuten, diese Funktion scheint ebenfalls zelltypspezifisch zu sein, da eine IFN  $\beta$  Induktion in den HeLa Replicon Zellen beobachtet werden konnte. Das Auftreten einer schwachen Geninduktion, mit dem Ausbleiben einer IFN  $\beta$  Produktion, nach der poly I:C Stimulation in den MH1 Zellen ist also nicht auf die NS3/4A Proteaseaktivität zurück zu führen, sondern vielmehr ein schon in den Hepa1-6 Zellen auftretendes Artefakt (Abbildungen 11 A, B und C, Seiten 58 und 59). Die poly I:C induzierte Suppression der HCV Replicon Replikation in den MH1 Zellen konnte ebenfalls als PKR unabhängig beschrieben werden. Eine poly I:C abhängige Aktivierung der PKR und die daraus resultierende Phosphorylierung des Translations Faktors eIF2 $\alpha$  konnte in den MH1 Zellen nicht nachgewiesen werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, kann das HCV durch sein NS5A Protein die PKR Aktivität unterbinden und so einer Blockade der Proteinbiosynthese und Virusproduktion entgehen (Gale et al 1998, Francois et al 2000). Der direkte Einfluss von poly I:C auf die Replicon Replikation bleibt noch zu erklären.

#### 4.2 Die Leber und ihre Beteiligung am angeborenen Immunsystem

Die Leber ist einer großen Anzahl antigenen Materials ausgesetzt, das über den systemischen Blutkreislauf aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber geführt wird (Freudenberg et al 1982, Nolan et al 1981 und Knolle und Gerken 2000). Ein Großteil der Antigene muss aus dem Blut entfernt werden, ohne eine pro-inflammatorische Reaktion auszulösen. Diese Aufgabe wird von den Kupffer Zellen und sinusoidalen Endothelzellen übernommen, die die antigenen Strukturen, wie zum Beispiel LPS, binden und durch Phagozytose aufnehmen und so aus dem Blut entfernen. Es konnte gezeigt werden, dass sich wiederholende Stimuli mit LPS in KC und LSEC eine Toleranz gegenüber weiteren pro-inflammatorischen Agenzien induzieren (Uhrig et al 2005). Diese Toleranz gegenüber den konstant über das zirkulierende Blut präsentierten Antigenen dient als Schutzmechanismus vor einer anhaltenden Entzündungsreaktion in der Leber. Das Auftreten höherer Konzentrationen an Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) führt dennoch zu einer

Aktivierung der Immunabwehr und somit zur Einleitung einer Entzündungsreaktion (Hafenrichter et al 1994 und Uhrig et al 2005). Das System der angeborenen Immunantwort erkennt PAMPs unter anderem über die *toll-like* Rezeptoren. Die Signalwege der einzelnen TLRs sind eng miteinander vernetzt und führen über eine Reihe von TIR (Toll/Interleukin-1 Rezeptor) Domänen enthaltenden Adapterproteinen, wie MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM, zu einer speziellen, für die TLRs typischen Freisetzung von Zytokinen und Botenstoffen. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 erkennen virale Strukturen und induzieren die Ausschüttung eines antiviral wirkenden Spektrums an Mediatoren, resultierend aus der NFκB-Aktivierung und der Ausschüttung von Typ-I und -II Interferonen. Das Binden der spezifischen Liganden an die *toll-like* Rezeptoren führt zur Auslösung einer Immunantwort über die pro-inflammatorisch wirkenden Signalkaskaden und reguliert in der Leber sowohl die antivirale und antibakterielle Immunantwort als auch regenerative Funktionen wie die Wundheilung. (O’Neil 2006 und Zhang und Schluesener 2006).

#### 4.2.1 TLR 3 und TLR 4 induzieren eine antivirale Antwort in den NPZ

Die Hypothese dieser Arbeit ist die TLR vermittelte Kontrolle der Hepatitis C Virus Replikation durch die nicht-parenchymatösen Zellen der Leber. Während der HCV Infektion produziert das Virus doppelsträngige RNA, die über zelluläre Rezeptoren, wie zum Beispiel den TLR 3, RIG-I oder PKR, detektiert werden kann und eine antivirale Immunantwort auslöst. Das Hepatitis C Virus hat eine Ausweichstrategie entwickelt und ist in der Lage diese Signalwege zu blockieren und das Auslösen einer Immunantwort in infizierten Zellen zu unterdrücken (Gale et al 1998, Francois et al 2000 und Li et al 2005). Dennoch konnte in Leberbiopsien von HCV infizierten Patienten ein Anstieg der Interferon induzierten Gene beobachtet werden (Helbig et al 2005).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl in KC als auch in LSEC ausschließlich die TLR 3 oder TLR 4 Agonisten ein antivirales Potenzial induzierten, das auf die Ausschüttung von IFN  $\beta$  zurückzuführen ist. Das Auslösen einer Interferonantwort in diesen Zellpopulationen, nach der

Behandlung mit dem Liganden des TLR 3, induziert indirekt, über die Ausschüttung von IFN  $\beta$ , eine Suppression der HCV Replicon Replikation in den MH1 Zellen. Die Sensitivität der NPZ gegenüber dsRNA lässt die Annahme zu, dass die NPZ an der, in HCV infizierten Patienten auftretenden Induktion der Interferon induzierten Gene beteiligt sein könnten (Helbig et al 2005). Die Möglichkeit einer Infektion dieser Zellpopulationen mit dem HCV sowie das daraus resultierende ISG Expressionsprofil sind bisher noch nicht beschrieben. Die Stimulation der KC oder LSEC mit den Agonisten für die restlichen TLRs hatte in diesem Versuchsablauf keinen Einfluss auf die Replikation des HCV Replicons in den MH1 Zellen. Broering et al haben anhand eines Expressionsprofils der Gene IL-6 und TNF  $\alpha$  die Aktivierung einer Zell internen Antwort nach Stimulation der KC und LSEC mit den TLR 1-9 gezeigt (Manuskript in Revision). Wu et al (2007) haben nachgewiesen, dass die Stimulation von TLR 8 und 9 zu einer erhöhten Präsentation von Oberflächenmarkern wie CD40, CD80, CD86 und den MHC II führte. Die Funktionalität der TLR Signalwege in den KC und LSEC konnte somit dargestellt werden. Lediglich die Ausschüttung von antiviral wirkenden Substanzen scheint auf die Stimulation der TLR 3 oder 4 begrenzt. Im Gegensatz zu den NPZ der Leber wurde in den myeloiden dendritischen Zellen, die aus dem Femur der Maus präpariert wurden, ein größeres Spektrum an TLRs (TLR 2, 3, 4, 7 und 9) aktiviert, die in der Co-Kultivierung mit den MH1 Zellen eine signifikante Suppression der HCV Replikation induzierten (Broering et al Manuskript in Revision). Das untypische Auslösen eines antiviralen Potenzials durch die Aktivierung des TLR 2 Signalweges in der mDC Zellpopulation konnte auf eine erhöhte IL-12 Expression zurück geführt werden, die wiederum die Expression von IFN  $\gamma$  in restlichen, in der Zellpopulation vorkommenden, Lymphozyten auslöst (Liew et al 2005 und Broering et al Manuskript in Revision). Wu et al zeigten ebenfalls, dass die mDC auf die Stimulation mit dem TLR 9 Agonisten ODN1260 sowohl mit der Ausschüttung von Interferon als auch mit der Produktion co-stimulierender Zytokine reagieren (Wu et al 2007). Während der TLR 3 Signalweg über die Aktivierung von TRIF zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und zu dessen Translokation in den Zellkern führt, wo er die IFN  $\beta$  Expression initialisiert, induziert die TLR 4 Stimulation zusätzlich über die MyD88 Kaskade

die NF $\kappa$ B Aktivierung (Akira und Takeda 2004 und Takeda und Akira 2005). Zu diesem Zeitpunkt ist es noch unklar, ob sich die TLR vermittelte Aktivierung dieser Signalwege sowohl in den einzelnen NPZ als auch in den mDC unterscheidet und entsprechend der hier gezeigten Ergebnisse eine zelltypspezifische Antwort auslösen.

#### 4.2.2 Einsatz von TLR Agonisten zur therapeutischen Unterstützung bei der Behandlung von Viruserkrankungen

Einige der TLR Agonisten wurden bereits für den therapeutischen Einsatz entwickelt und in Studien eingesetzt. Die Verwendung der TLR 3 und 4 Agonisten zur therapeutischen Unterstützung ist bisher kaum diskutiert, während Untersuchungen an Mäusen ergeben hatten, dass der Einsatz des TLR 9 Agonisten CpG ODN (Oligodesoxynukleotide) eine Immunantwort auslöst, die gegen ein weites Spektrum viraler und bakterieller Pathogene gerichtet ist (Cho et al 2001, Klinman et al 1999, Olbrich et al 2002 und Pyles et al 2002). Für die therapeutische Verwendung wurden die CpG ODN synthetisch hergestellt und mit Modifikationen versehen, wie zum Beispiel dem Hinzufügen von Phosphorthiolaten, einer Schutzvorrichtung vor der Degradation durch Nukleasen. Diese Modifikation verlängert die Halbwertszeiten und induziert somit eine stärkere Immunantwort (Krieg 2006). Der TLR 9 Agonist CPG 10101 (Coley, Wellesley, Massachusetts, USA) wurde bereits in der Therapie gegen HCV eingesetzt. In einer 4-wöchigen Phase Ib Studie konnte für CPG 10101 nur eine geringfügige Suppression von HCV beobachtet werden, die mit dem Anstieg der Biomarker für eine TLR 9 Aktivierung einherging, wie zum Beispiel der Aktivierung von NK Zellen, dem Auftreten erhöhter Serumlevel an IFN  $\alpha$  als auch IFN induzierter Chemokine (McHutchinson und Fried 2005). Die geringe Effektivität im klinischen Einsatz führte jedoch zum Einstellen der klinischen Weiterentwicklung dieses Medikamentes seitens des Herstellers.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Replicon System konnte dem TLR 7 in einem humanen HCV Replicon System sowohl eine Interferon bedingte als auch eine Interferon unabhängige antivirale Wirkung zugeordnet werden. Gründe für ein nicht Ansprechen des hier verwendeten MH1 Replicon Systems

könnte die Verwendung unterschiedlicher Liganden sein. Des Weiteren bestehen die Möglichkeiten der kombinierten Stimulation von TLRs, zum Beispiel die gleichzeitige Stimulation des TLR 8, sowie die Exposition der Liganden auf oder in den Zellen. Isatoribin, ein Agonist des TLR 7, wurde bereits in ersten klinischen Studien (engl. „proof of concept“ Studie, POC), bei HCV infizierten Patienten eingesetzt und induzierte einen signifikanten Rückgang der Viruslast, begleitet von der Induktion TLR 7 typischer immunologischer Marker (Lee et al 2006 und Horsmans et al 2005).

Der Einsatz von TLR Agonisten zur unterstützenden Therapie viraler Erkrankungen, speziell bei HCV Infektionen, bleibt ein interessanter Ansatz und könnte, entsprechend der hier gezeigten Ergebnisse, auch für die TLR 3 und TLR 4 eine viel versprechende Möglichkeit darstellen, die lokale Immunantwort gegen das Hepatitis C Virus zu unterstützen.

#### 4.3 Einfluss ausgesuchter ISGs auf die HCV Replicon Replikation

##### 4.3.1 Expression der ISGs

Typ-I Interferone spielen eine essentielle Rolle in der wirtseigenen Abwehr gegen virale Infektionen. Die Induktion einer Reihe von Genen, die sowohl für direkt antiviral wirkende Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Apoptose induzierende Proteine oder Zytokine codieren, als auch die Suppression von Genen, die am Metabolismus oder an der Biosynthese von Makromolekülen beteiligt sind, führt dazu, die Replikation der Virus befallenen Zelle einzustellen und die Abwehr der Pathogene einzuleiten (Taylor et al 2004). Die Expressionsprofile, die durch Interferone induziert werden, variieren jedoch in Abhängigkeit von den verwendeten Typ-I oder Typ-II Interferonen, von den jeweiligen Zelltypen, als auch von donorspezifischen Faktoren (Schlaak et al 2002, Indraccolo et al 2007 und Hilkens et al 2003). Die HCV Replicon Replikation in den Zellkultursystemen induziert im Vergleich zu den parental Zellen keine Veränderungen in den Transkriptionsprofilen (Hayashi et al 2005).

Wie bei Untersuchungen an Leberbiopsien von HCV infizierten Patienten festgestellt werden konnte, unterscheiden sich die Basisexpressionen der ISGs

(Chen L et al 2005). Hierbei korrelierten einige der differentiell exprimierten Gene mit dem Ansprechen auf die Therapie, so dass schon vor Beginn der Therapie eine Prognose über deren Ausgang gemacht werden kann. Unter diesen Genen befinden sich auch die in dieser Arbeit beobachteten ISGs IFI-T1, ISG15, Herc5, Rsad2 und G1P3. Chen et al konnten zeigen, dass die Grundexpression dieser Gene in den Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen, erhöht ist. In einer bisher unveröffentlichten Studie (Trippler et al, Manuskript in Vorbereitung), konnte für die Expression dieser Gene ebenfalls eine Korrelation mit dem Nichtansprechen auf die Interferon Therapie im Sinne eines anhaltenden Rückgangs der Viruslast gezeigt werden. Hierbei wurden 12 Stunden vor Beginn der Therapie und 12 Stunden nach der ersten Gabe des Interferons PBMC aus dem Blut der Patienten isoliert, mittels Microarray Analyse ein Transkriptionsprofil erstellt und die IFN abhängige Geninduktion bestimmt.

#### 4.3.2 Suppression der Genexpression der ISGs mittels siRNA

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hatte die Suppression der Expression ausgesuchter ISGs (IFI-T1, ISG15, Herc5, Rsad2 und G1P3) mittels siRNA keinen Einfluss auf den Interferon induzierten Rückgang der HCV Replicon Replikation *in vitro*. Mit der Reduktion der Grundexpressionen einzelner ISGs als auch des gesamten Kollektivs wurde die Sensitivität gegenüber dem eingesetzten Interferon nicht erhöht. Die Basisexpressionen der aufgezeigten ISGs scheinen entgegen der Annahme, dass sie, wie zuvor beschrieben, mit dem Nichtansprechen auf die Interferon Therapie korrelieren, *in vitro* keinen Einfluss auf die Interferonsensitivität zu haben. Ebenso wenig scheint eines der Gene essentiell für die Interferonantwort zu sein, da trotz 90%-igem Ausschalten der Gene, eine gleich bleibende Suppression der HCV Replikation durch IFN induziert werden konnte.

#### 4.3.3 Antivirale Funktionen des ISG15

Ubiquitin und Ubiquitin ähnliche Proteine, wie das ISG15, bekommen in der derzeitigen Forschung immer mehr Beachtung, da sie durch posttranslationale Modifizierungen eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen. Das ISG15 und seine Konjugationsenzyme (E1 = Ube1L, E2 = Ubch8 und E3 = Herc5) sowie die dekonjugierende Protease Usp18 gehören zu den durch Interferon induzierten Genen und regulieren den Verlauf der Interferonantwort. Die kovalente Bindung des ISG15 an die Zielproteine, die wiederum größtenteils zu den ISGs gehören, führt zu einer Verstärkung ihrer Wirkung, und somit zu einer effektiveren Immunantwort. Ebenfalls mit ISG15 konjugiert werden Proteine aus den Funktionssbereichen der Translation, Glykolyse, Stressantwort und Zell-Motilität (Giannakopoulos et al 2005, Loeb und Haas 1992, Kim et al 2004 und Malakhov et al 2002). Des Weiteren wird dem ISG15 eine antivirale Wirkung zugesprochen, die darin begründet sein kann, dass ISG15 als Zytokin sezerniert wird und pro-inflammatorisch sowohl die Proliferation von Natürlichen Killerzellen, die IFN  $\gamma$  Produktion, Reifung von dendritischen Zellen als auch die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beeinflusst, oder aber eine direkte antivirale Wirkung induziert, indem es durch Konjugation zelleigene oder virusspezifische Funktionen modifiziert (Lenschow et al 2007, Padovan et al 2002 und D'Cunha et al 1996). Die direkte antivirale Funktion des ISG15 gegenüber Influenza, Herpes oder Sinbis Viren und bereits aufgezeigte Ausweichmechanismen, wie sie zum Beispiel für das Influenza B Virus gezeigt werden konnten, unterstreichen die direkte Beteiligung des ISG15 an den zellulären Abwehrmechanismen (Lenschow et al 2007 und Yuan und Krug 2001).

##### 4.3.3.1 ISG15 und die Wirkung auf HCV

Wie zuvor beschrieben, steht unter anderem die Basisexpression, als auch die Interferon induzierte Expression, des ISG15 in Korrelation mit dem Nichtansprechen von HCV infizierten Patienten auf die Interferon Therapie. Bei einem hohen Expressionslevel und einem davon ausgehenden hohen Proteinanteil an ISG15, scheint es zu einer Reduktion der Intensität der IFN

Antwort zu kommen. Randall et al (2006) haben anhand eines HCV Zellkultursystems gezeigt, dass eine anhaltende ISGylierung, initiiert durch das Ausschalten des Gens für die ISG15-dekonjugierende Protease Usp18, zu einer verstärkten und anhaltenden Interferonantwort führt. Dies führt zu der Annahme, dass das Ausbleiben einer effektiven Interferonantwort durch die hohe Basisexpression des ISG15 (Chen et al 2005) entweder einem negativ regulierten Mechanismus, der zum Abbau oder der Dekonjugation des ISG15 führt, oder aber einen direkten, positiven Einfluss des ISG15 auf die virale Replikation des Hepatitis C Virus widerspiegelt. Die hier präsentierten Ergebnisse, die die Suppression der ISG15 Genexpression auf Transkriptionsebene mit einem signifikanten Rückgang der HCV Replikation in Verbindung bringen, unterstützen die Hypothese einer direkten Beteiligung des ISG15 an der viralen Replikation.



#### 4.4 Ausblicke

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die murinen Kupffer Zellen und sinusoidalen Endothelzellen der Leber in der Lage sind, über den TLR 3 beziehungsweise TLR 4 Signalweg, Einfluss auf die HCV Replikation eines subgenomischen Replicon Systems zu nehmen. Weiterführend sollte dieses Projekt auf humane Primärzellen der Leber übertragen werden. Die Präparation der humanen KC und LSEC stellte sich jedoch als schwierig heraus und wird zu diesem Zeitpunkt noch optimiert. Die Isolation der humanen NPZ ist kompliziert, da die Leber nicht in situ perfundiert werden kann. Es handelt sich größten Teils um Explantate mit schon fibrotischen oder auch zirrhotischen Übergangsformen sowie mit beginnenden Nekrotestadien. Außerdem sind die Zellen durch Medikamenteneinsatz und durch das Narkosemittel, welche über die Leber verstoffwechselt werden, vorstimuliert. Des Weiteren könnte auf zellulärer Ebene der gleichzeitige Einsatz der TLR Liganden mit, schon in der Therapie eingesetzten, Medikamenten untersucht werden. Glucocorticosteroide, die bei Patienten nach Lebertransplantation zur Immunsuppression eingesetzt werden, lösen in HCV infizierten Patienten einen Anstieg der Viruslast aus. Die zeitgleiche Behandlung mit TLR Liganden, deren Signalwege nicht der Immunsuppression unterliegen, stellt eine wertvolle Therapiemöglichkeit dar.

Wie in dieser Arbeit beschrieben, hatte der Gen-*Knockout* einzelner, als auch kombinierter, ISGs keinen Einfluss auf die Induktion einer Interferonantwort. Von Interesse bleibt der mögliche Einfluss einer Überexpression auf diese, und weitere, ISGs im Zusammenhang mit der IFN induzierten Suppression der HCV Replikation. Der in dieser Arbeit dargestellte antivirale Effekt, der beim Ausschalten der ISG15 Genexpression zu einem Rückgang der HCV Replicon Replikation führte, bleibt genauer zu determinieren. Auf Proteinebene können hier Änderungen in den ISGylierungsmustern sowie direkte Interaktionen des ISG15 mit den viralen Nichtstrukturproteinen überprüft werden. Auch die Überexpression des ISG15 und die daraus resultierende Auswirkung auf die HCV Replikation bleiben zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Einflussnahme von *in vitro* Kulturmodellen auf die Replikation subgenomischer Hepatitis C Virus (HCV) Replicons. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Beteiligung der nicht-parenchymatösen Leberzellen wie Kupffer Zellen (KC) und sinusoidalen Endothelzellen LSEC an der Kontrolle der HCV Replikation dargestellt. Es wurde gezeigt, dass die KC und LSEC über den Signalwege des *toll-like* Rezeptor 3 eine antivirale Immunantwort auslösen. Die KC zeigen auch ein *toll-like* Rezeptor 4 abhängiges antivirales Potenzial. In Co-Kultivierungsversuchen mit der HCV Replicon replizierenden MH1 Zelllinie wurde in beiden Fällen eine Interferon  $\beta$  vermittelte Suppression der viralen Replikation gezeigt. Die Sensitivität der Kupffer Zellen und sinusoidalen Endothelzellen der Leber gegenüber doppelsträngiger Ribonukleinsäure (RNS/RNA) bietet eine mögliche Erklärung für die, in HCV infizierten Patienten vorkommende, erhöhte Expression Interferon sensibler Gene. Diese neuartige Sichtweise unterstreicht die Wichtigkeit des angeborenen Immunsystems der Leber an der Kontrolle der HCV Infektion. Des Weiteren bilden diese Ergebnisse eine Basis für eine viel versprechende Möglichkeit, die lokale Immunantwort, während der Therapie gegen das Hepatitis C Virus, über die *toll-like* Rezeptoren 3 und 4 unterstützend zu induzieren.

Der zweite Teil der Arbeit fokussierte die zelluläre Interferonantwort. Typ-I Interferone spielen eine essentielle Rolle in der wirtseigenen Abwehr gegen virale Infektionen. Die Induktion einer Reihe von Interferon sensiblen Genen (ISGs), führt dazu, die Replikation der Virus befallenen Zelle einzustellen und die Abwehr der Pathogene einzuleiten. Die ISGs bieten eine breite Angriffsfläche zur Einflussnahme der zelleigenen Immunabwehr sowie der viralen Replikation. Es wurde gezeigt, dass die *in vitro* Suppression der Expression ausgesuchter ISGs (IFI-T1, ISG15, Herc5, Rsad2 und G1P3) mittels RNA Interferenz Technologie keinen Einfluss auf die Interferonsensitivität der HCV Replicon Replikation hat. Eine direkte Suppression der HCV Replicon Replikation wurde durch das Ausschalten der ISG15 Genexpression ausgelöst. Dieser signifikante Rückgang der Virus Replikation begründet die Hypothese einer direkten Beteiligung des ISG15 an der Hepatitis C Virus Replikation.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akira, S., Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* Jul 4(7), 499-511.
2. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* Feb 24;124(4), 783-801.
3. aus dem Siepen, M., Lohmann, V., Wiese, M., Ross, S., Roggendorf, M., Viazov, S. (2005): Nonstructural protein 5A does not contribute to the resistance of hepatitis C virus replication to interferon alpha in cell culture. *Virology.* Jun 5;336(2), 131-136.
4. Bartenschlager, R., Frese, M., Pietschmann, T. (2004): Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res.* 63, 171-180.
5. Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. (2000): Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.* Dec 8;290(5498), 1972-1974.
6. Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., Rice, C. M. (2003): Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol.* Mar 77(5), 3181-3190.
7. Blight, K. J., McKeating, J. A., Rice, C. M. (2002): Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* Dec 76(24), 13001-13014.
8. Borghans, J. A., Noest, A. J., De Boer, R. J. (1999): How specific should immunological memory be? *J Immunol.* Jul 15;163(2), 569-575.
9. Brass, V., Moradpour, D., Blum, H. E. (2006): Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci.* 3(2), 29-34.
10. Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L. L., Coltescu, C., Heathcote, J., Edwards, A. M., McGilvray, I. D. (2005): Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology.* May 128(5), 1437-1444.
11. Cho, J. Y., Miller, M., Baek, K. J., Castaneda, D., Naya, r J., Roman, M., Raz, E., Broide, D. H. (2001): Immunostimulatory DNA sequences inhibit respiratory syncytial viral load, airway inflammation, and mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol.* Nov 108(5), 697-702.
12. Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R. M., Huibregtse, J. M. (2006):

- Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem.* Feb 17;281(7), 4334-4338.
13. Davis, G. L., Wong, J. B., McHutchison, J. G., Manns, M. P., Harvey, J., Albrecht, J. (2003): Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* Sep 38(3), 645-652.
  14. D'Cunha, J., Knight, E. Jr., Haas, A. L., Truitt, R. L., Borden, E. C. (1996): Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 9;93(1), 211-215.
  15. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., Silverman, R. H. (1998): Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 22;95(26), 15623-15628.
  16. Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., Knolle, P. A. (2007): Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8(+) T cell tolerance. *Hepatology.* Nov 1, [Epub ahead of print].
  17. Evans, M. J., Rice, C. M., Goff, S. P. (2004): Genetic interactions between hepatitis C virus replicons. *J Virol.* Nov 78(21), 12085-12089.
  18. Foy, E., Li, K., Sumpter, R. Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., Gale, M. Jr. (2005): Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 22;102(8), 2986-2991.
  19. Fraser, R., Dobbs, B. R., Rogers, G. W. (1995): Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis. *Hepatology.* Mar 21(3), 863-874.
  20. Freudenberg, M.A., Freudenberg, N., Galanos, C. (1982): Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol.* Feb 63(1), 56-65.
  21. Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L. Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. (2002): Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* Sep 26;347(13), 975-982.

22. François, C., Duverlie, G., Rebouillat, D., Khorsi, H., Castelain, S., Blum, H. E., Gagnon, A., Wychowski, C., Moradpour, D., Meurs, E. F. (2000): Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol.* Jun 74(12), 5587-96.
23. Gale, M. Jr, Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Katze, M. G. (1998): Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol.* Sep 18(9), 5208-18.
24. Gerns, D., Kalden, J. R., Resch, K. (1997) Immunologie 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York
25. Giannakopoulos, N. V., Luo, J. K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., Borden, E. C., Li, J., Virgin, H. W., Zhang, D.E. (2005): Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 21;336(2), 496-506.
26. Gorczynski, R. M., Hozumi, N., Wolf, S., Chen, Z. (1995): Interleukin 12 in combination with anti-interleukin 10 reverses graft prolongation after portal venous immunization. *Transplantation.* Dec 15;60(11), 1337-1341.
27. Guo, J. T., Bichko, V. V., Seeger, C. (2001): Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* Sep 75(18), 8516-8523.
28. Guo, J. T., Zhu, Q., Seeger, C. (2003): Cytopathic and noncytopathic interferon responses in cells expressing hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol.* Oct 77(20), 10769-10779.
29. Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Wagner, H. (2000): Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med.* Aug 21;192(4), 595-600.
30. Hadziyannis, S. J., Sette, H. Jr., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H. Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., Ackrill, A. M. (2004): PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* Mar 2;140(5), 346-355.

31. Hafenrichter, D. G., Roland, C. R., Mangino, M. J., Flye, M. W. (1994): The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock*. Oct 2(4), 251-256.
32. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. Mar 16;404(6775), 293-296.
33. Harder, R., Uhlig, H., Kashan, A., Schütt, B., Duijvestijn, A., Butcher, E. C., Thiele, H. G., Hamann, A. (1991): Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: novel mechanisms mediating basal binding, and alpha 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Exp Cell Res*. Dec 197(2), 259-67.
34. Hayashi, J., Stoyanova, R., Seeger, C. (2003): The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology*. May 10;335(2) 264-275.
35. Hegenbarth, S., Klugewitz, K., Hamann, A., Diehl, L., Knolle P. A. (2006): Efficient isolation of liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) by immunomagnetic separation. *MACS&more* Jan 10, 8-10.
36. Helbig, K. J., Lau, D. T., Semendric, L., Harley, H. A., Beard, M. R. (2005): Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology*. Sep 42(3), 702-10.
37. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., Akira, S. (2003): The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol*. Mar 15;170(6), 3059-3064.
38. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., Akira, S. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. Feb 3(2), 196-200.
39. Herrine, S. K., Brown, R. S. Jr., Bernstein, D. E., Ondovik, M. S., Lentz, E., Te, H. (2005): Peginterferon alpha-2a combination therapies in chronic hepatitis C patients who relapsed after or had a viral breakthrough on therapy with standard interferon alpha-2b plus ribavirin: a pilot study of efficacy and

- safety. *Dig Dis Sci.* Apr 50(4), 719-726.
40. Hilkens, C. M., Schlaak, J. F., Kerr, I. M. (2003): Differential responses to IFN- $\alpha$  subtypes in human T cells and dendritic cells. *J Immunol.* Nov 15;171(10), 5255-5263.
  41. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* May 21;284(5418), 1313-1318.
  42. Honda, K., Taniguchi, T. (2006): IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol.* Sep 6(9), 644-658.
  43. Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W. C., Taniguchi, T. (2004): Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 15416-15421.
  44. Hoofnagle, J. H. (2002): Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* Nov 36, 21-29.
  45. Horsmans, Y., Berg, T., Desager, J. P., Mueller, T., Schott, E., Fletcher, S. P., Steffy, K. R., Bauman, L. A., Kerr, B. M., Averett, D. R. (2005): Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* Sep 42(3), 724-731.
  46. Indraccolo, S., Pfeffer, U., Minuzzo, S., Esposito, G., Roni, V., Mandruzzato, S., Ferrari, N., Anfosso, L., Dell'Eva, R., Noonan, D. M., Chieco-Bianchi, L., Albini, A., Amadori, A. (2007): Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J Immunol.* Jan 15;178(2), 1122-1135.
  47. Inohara, N., Nunez, G. (2003): NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* May 3(5), 371-382.
  48. Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., Fukuhara, S. (2002): Interferon- $\alpha$  and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med.* Jun 3;195(11), 1507-1512.
  49. Janeway, C.A. Jr., Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20, 197-216.
  50. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M.,

- Wakita, T. (2003): Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. Dec 125(6), 1808-1817.
51. Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S. (2004): Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. Oct 5(10), 1061-1068.
  52. Kim, K. I., Giannakopoulos, N. V., Virgin, H. W., Zhang, D. E. (2004): Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol*. Nov 24(21), 9592-9600.
  53. Klinman D. M., Conover, J., Coban, C. (1999): Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun*. Nov 67(11), 5658-5663.
  54. Knolle, P. A., Gerken, G. (2000): Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*. Apr 174, 21-34.
  55. Knolle, P. A., Löser, E., Protzer, U., Duchmann, R., Schmitt, E., zum Büschenfelde, K. H., Rose-John, S., Gerken, G. (1997): Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol*. Mar 107(3), 555-61.
  56. Krieg, A. M. (2006): Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. Jun 5(6), 471-484.
  57. Lanford, R. E., Guerra, B., Lee, H., Averett, D. R., Pfeiffer, B., Chavez, D., Notvall, L., Bigger, C. (2003): Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol*. Jan 77(2), 1092-1104.
  58. Lee, J., Wu, C. C., Lee, K. J., Chuang, T. H., Katakura, K., Liu, Y. T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., Cottam, H. B., Lai, M. M., Raz, E., Carson, D. A. (2006): Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 7;103(6), 1828-1833.
  59. Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E., Garcia-Sastre, A., Leib, D. A., Pekosz, A., Knobeloch, K. P., Horak, I., Virgin, H. W. (2007): IFN-stimulated



- gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 23;104(4), 1371-1376.
60. Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Raym S. C., Gale, M. Jr., Lemon, S. M. (2005): Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 22;102(8), 2992-2997.
  61. Li, Q., Verma, I. M. (2002): NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* Oct 2(10), 725-734.
  62. Liew, F. Y., Patel, M., Xu, D. (2005): Toll-like receptor 2 signalling and inflammation. *Ann Rheum Dis.* Nov 64(4), 104-5.
  63. Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., Rice, C. M. (2005): Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* Jul 22;309(5734), 623-626.
  64. Lindenbach, B. D., Rice, C. M. (2005): Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* Aug 18;436(7053), 933-938.
  65. Lippert, H. (2003) *Lehrbuch Anatomie 6. Auflage*, München, Urban und Fischer Verlag
  66. Loeb, K. R., Haas, A. L. (1992): The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem.* Apr 15;267(11), 7806-7813.
  67. Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., Bartenschlager, R. (2003): Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol.* Mar 77(5), 3007-3019.
  68. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999): Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* Jul 2;285(5424), 110-113.
  69. Magnusson, S., Berg, T. (1989): Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells. *Biochem J.* Feb 1;257(3), 651-656.
  70. Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. I., Ritchie, K. J., Zhang, D. E. (2002): UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem.* Mar 22;277(12), 9976-9981.

71. Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J. K. (2001): Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. Sep 22;358(9286), 958-965.
72. McHutchison, J. G., Fried, M. W. (2003): Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. *Clin Liver Dis*. Feb 7(1), 149-161.
73. Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., Kneteman, N. M. (2001): Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*. Aug 7(8), 927-933.
74. Modrow S., Falke D. (1997). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
75. Moreno-Otero, R. (2005): Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges and development. *J Viral Hepat*. Jan 12(1), 10-19.
76. Nolan, J. P. (1981): Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology*. Sep-Oct 1(5), 458-465.
77. Olbrich, A. R., Schimmer, S., Heeg, K., Schepers, K., Schumacher, T. N., Dittmer, U. (2002): Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J Virol*. Nov 76(22), 11397-11404.
78. O'Neill, L. A. (2006): How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*. Feb 18(1), 3-9.
79. Padovan, E., Terracciano, L., Certa, U., Jacobs, B., Reschner, A., Bolli, M., Spagnoli, G. C., Borden, E. C., Heberer, M. (2002): Interferon stimulated gene 15 constitutively produced by melanoma cells induces e-cadherin expression on human dendritic cells. *Cancer Res*. Jun 15;62(12), 3453-3458.
80. Peters, G. A., Hartmann, R., Qin, J., Sen, G. C. (2001): Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol*. Mar 21(6), 1908-1920.
81. Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., Bartenschlager, R. (2002): Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*. Apr 76(8), 4008-

4021.

82. Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., Bartenschlager, R. (2001): Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol.* Feb 75(3), 1252-1264.
83. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998): Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* Oct 30;282(5390), 938-941.
84. Pyles, R. B., Higgins, D., Chalk, C., Zalar, A., Eiden, J., Brown, C., Van Nest, G., Stanberry, L. R. (2002): Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol.* Nov 76(22), 11387-11396.
85. Randall, G., Chen, L., Panis, M., Fischer, A. K., Lindenbach, B. D., Sun, J., Heathcote, J., Rice, C. M., Edwards, A. M., McGilvray, I. D. (2006): Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* Nov 131(5), 1584-1591.
86. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., Harrison, D. A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* Mar 15(117), 1281-1283.
87. Schlaak, J. F., Hilkens, C. M., Costa-Pereira, A. P., Strobl, B., Aberger, F., Frischauf, A. M., Kerr, I. M. (2002): Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha. Use of customized gene arrays. *J Biol Chem.* Dec 20;277(51), 49428-49437.
88. Schindler, C. W. (2002): JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest.* 109, 1133-1137.
89. Schnare, M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R. (2000): Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol.* Sep 21;10(18), 1139-4112.
90. Sen, G. C. (2001): Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol.* 55, 255-281.
91. Seth, R. B., Sun, L., Chen, Z. J. (2006): Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* Feb 16(2), 141-147.
92. Shata, M. T., Anthony, D. D., Carlson, N. L., Andrus, L., Brotman, B., Tricoche, N., McCormack, P., Prince, A. (2002): Characterization of the immune response against hepatitis C infection in recovered, and chronically infected chimpanzees. *J Viral Hepat.* Nov 9(6), 400-410.

93. Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., Frank, J. (2001): Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*. Mar 9;291(5510), 1959-1962.
94. Steffan, A. M., Gendraltm J, L., McCuskey, R. S., McCuskey, P. A., Kirn, A. (1986): Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology*. Sep-Oct 6(5), 830-836.
95. Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., Enk, A. H. (1997): Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. Nov 15;159(10), 4772-4780.
96. Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. Jan 17(1), 1-14.
97. Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., Akira, S. (2000): Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. Jan 12(1), 113-117.
98. Taylor, M. W., Grosse, W. M., Schaley, J. E., Sanda, C., Wu, X., Chien, S. C., Smith, F., Wu, T. G., Stephens, M., Ferris, M. W., McClintick, J. N., Jerome, R. E., Edenberg, H. J. (2004): Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. *J Interferon Cytokine Res*. Feb 24(2), 107-118.
99. Uhrig, A., Banafsche, R., Kremer, M., Hegenbarth, S., Hamann, A., Neurath, M., Gerken, G., Limmer, A., Knolle, P. A. (2005): Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*. May 77(5), 626-633.
100. Visvanathan, K., Lewin, S. R. (2006): Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. *Semin Liver Dis*. May 26(2), 104-115.
101. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J. (2005): Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. Jul 11(7), 791-796.
102. Wu, J., Lu, M., Meng, Z., Trippler, M., Broering, R., Szczeponek, A., Krux, F., Dittmer, U., Roggendorf, M., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2007): Toll-like

- receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology*. Oct 10;46(6), 1769-1778 [Epub ahead of print].
103. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. (2004): The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. Jul 5(7), 730-737.
104. Youn, J. W., Park, S. H., Lavillette, D., Cosset, F. L., Yang, S. H., Lee, C. G., Jin, H. T., Kim C. M., Shata, M. T., Lee, D. H., Pfahler, W., Prince, A. M., Sung, Y. C. (2005): Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. *Hepatology*. Dec 42(6), 1429-1436.
105. Yuan, W., Krug R. M. (2001): Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*. Feb 1;20(3), 362-371.
106. Zhang, Z., Schluesener, H. J. (2006): Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci*. Dec 63(24), 2901-2907.
107. Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S., Krug, R. M. (2005): Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 19;102(29), 10200-10205.
108. Zhu, Q., Guo, J. T., Seeger, C. (2003): Replication of hepatitis C virus Subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol*. Sep 77(17), 9204-9210.

## 7. Anhang

### 7.1 Chemikalien-Verzeichnis

2-Mercaptoethanol, Sigma # M-7522  
Albumin Standard (2mg/ml), Pierce # 23210  
Anti-LSEC MicroBeads mouse; clone: ME-9F1, Miltenyi Biotec # 130-092-007  
Anti-mouse IgG (goat), Pierce # 31430  
Anti-rabbit IgG (goat), Sigma # A-8275  
 $\beta$ -Aktin Antikörper, Sigma # A-5441  
BCA-Kit - D<sub>C</sub>Protein assay, BioRad # 500-0113, 500-0114, 500-0115  
Bromphenolblau, Sigma # B-8026  
BSA, PAA # K45-001  
CellWASH<sup>®</sup>, BD Biosciences # 349524  
complete Mini, EDTA free (Protease inhibitor), Roche # 11 836 170 001  
D(+)-Glukose, Sigma # G-7520  
DMEM, PAA # E 15-843  
Deoxycholic acid, Sigma # D-6750  
eIF2 $\alpha$  Antikörper, New England Biolab # 9722  
Entwicklerkonzentrat, Adelfo # 00011  
Ethanol, Riedell de Haën # 32205  
FITC Rat Anti-Mouse CD14, BD Biosciences # 553739  
Fixierkonzentrat, Adelfo # 00064  
FKS, PAA # A15-041 Lot.Nr. A04105-0180/R1962  
Flagellin (S.typhimurium) (100 $\mu$ g), Invivogene # tlrl-stfla  
Fruktose, Sigma # F-3510  
FSL-1 (100 $\mu$ g), Invivogene # tlrl-fsl  
Gardiquimod (1mg), Invivogene # tlrl-gdq  
Geneticin, PAA # P11-012  
Glycerol, Sigma # G-5516  
Glycin, ICN # 808822  
Halt<sup>™</sup> Phosphatase Inhibitor, Pierce # 78420  
HCV NS5 Antikörper, ibt # HCV-131-5

Hepes, Gerbu # 1009  
HKLM (1010Zellen), Invivogene # tlr-hklm  
Interferon  $\alpha$ AD human, Sigma # I-4401  
Kaliumchlorid, Gerbu # 4933  
L-Alanin, Gerbu # 1627  
L-Asparaginsäure, Gerbu # 1621  
L-Glutamin, Gibco # 25030  
L-Glutaminsäure, Sigma # G-8415  
LPS-EB ultrapure (5mg), Invivogene # tlr-pelps  
L-Serin, Sigma # S-4311  
L-Threonin, Sigma # T-8441  
Magermilchpulver, AppliChem # A0830  
Magnesiumchlorid, Merck # 8.14733  
Methanol, Fluka # 65543  
murines IFN  $\alpha$  , Sigma # I-8782  
murines IFN  $\beta$ , Sigma # I-9032  
murines IFN  $\gamma$ , PBL Biomedical Laboratories # 12500-1  
Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen-APC, Acris # BM4008APC  
mouse IgG (blocking solution), Sigma # I-5381  
Natriumchlorid, Gerbu # 1112  
Natriumdihydrogenphosphat, Aldrich # 33,198-8  
Natriumhydrogencarbonat, Merck # 6329  
neutralisierender Antikörper gegen murines IFN  $\alpha$  , Calbiochem # 407291  
neutralisierender Antikörper gegen murines IFN  $\beta$  , Calbiochem # 407307  
neutralisierender Antikörper gegen murines IFN  $\gamma$ , eBioscience # 16-7312  
NP-40 Nonidet<sup>®</sup> P40 Substitute , Fluka # 74385  
ODN 1826 (200 $\mu$ g), Invivogene # tlr-modn  
Optiprep, Progen Biotechnology # 1030061  
Pam3CSK4 (1mg), Invivogene # tlr-pm3  
PBS, Gibco # 14190  
Pen./Strep. PAA # P11-010  
PerCP-Cy5.5 Rat Anti-Mouse CD11b, BD Biosciences # 550993  
phospho - eIF2 $\alpha$  Antikörper, New England Biolab # 9721

polyI:C (50mg), Amersham # 27-4729-01  
Quantitec SYBR-Green RT-PCR-Kit, Qiagen # 204243  
rekombinantes humanes TGF- $\beta$ 1, R&D systems, # 240-B  
rekombinantes Maus Interleukin-10, BIOSOURCE # PMC0104  
RNeasy-Kit, Qiagen # 74106  
Saccharose, Merck # 1.07653  
SDS, MP Biomedicals # 811030  
Silicone Solution, Serva # 35130.02  
ssRNA40 (100 $\mu$ g), Invivogene # tlr-lrna40  
Trizma<sup>®</sup> hydrochlorid solution, Sigma # T-2663  
TRIZOL, Invitrogen # 15596-018  
Trypsin-EDTA, PAA # L11-004  
Tween 20, Sigma # P-7949  
Zelllysate, Positivkontrolle (C6 + Thapsigargin) , New England Biolab # CST900



## 7.2 Sequenzanalyse

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

NP_778154      MDNPGPSLRGAFGILGALERDRLTHLKHKLGLCSGSGQESKLLHAMVLLALGQDTEARVS 60
BAC44839      MACTGPSLPSAFDILGAAGQDKLLYLKHKLKTTPRPGCQGQDLLHAMVLLKLGQETEARIS 60
               * .**** .**.***** :*: :***** : .*. .***** ***:****:*

NP_778154      LESLKMNTVAQLVAHQWADMETTEGPEEPPDLSWTVARLYHLLAEENLCPASTRDMAYQV 120
BAC44839      LEALKADAVARLVARQWAGVDSTEDPEEPPDVSWAVARLYHLLAEKLCPASLRDVAYQE 120
               **:* :*:**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

NP_778154      ALRDFASQGDHQLGQLQNEAWDRCSSDIKGDPSGFQPLHSHQGSQPPSASPATRSQPR 180
BAC44839      AVRTLSSRDDHRLGELQDEARNRCGWDIAGDPGSIRTLQSNLGLPSSALPSGTRSLPR 180
               *: * :*:.*:*:*:*:*:*:* * . ** *** .:*.*: : * . * * : * * *

NP_778154      PID-TPDWSWGHTLHSTNSTASLASHLEISQSPTLAFLSSHGHGTHGPSKLCNTPLDTQEP 239
BAC44839      PIDGVSDWSQGCSLRSTGSPASLASNLEISQSPTMPFSLHRSPhGPSKLCDDPQASLVP 240
               *** .*** * :*:**.* *****:*****: .*** *: .*****: * : *

NP_778154      QLVPEGCEPEEISWPPSVETSVSLGLPHEIS--VPEVSPPEEASPILPDALAAPDTSVHC 297
BAC44839      EPVPGGCQEPEEWSWPPSGEIASPPELPSSPPPGLPEVAPDATSTGLPDTPAAPETSTNY 300
               : ** *****:***** * : . ** . :****: :. ***: ***:**.*:

NP_778154      PICTELSTNSRSLTSTTESVGKQWPITSQRSPQVPVGGDSLQNTTSSSPPAQPPSLQA 357
BAC44839      PVECTEGSAGPQSLPLPILEPVKNPCSVKDQTPQLSVEDTTSPTNKPCPP--TPPTPET 358
               *:**** *:..:* . *.* : .:..* . *:.* * : **...* *.: :

NP_778154      SPKLPPSPLSSASSPSSYPAPPTSTSPVLHDSETSDQKFYNFVVIHARADEQVALRIREK 417
BAC44839      SPPPPPPPS--STPCSAHLTPSSLPSSLESS-SEQKFYNFVILHARADEHIALRVREK 415
               ** **.* * :*:.* .*: * .*. *****:*****:****:*

NP_778154      LETLGVDPDGFCEEFQVPGRGELHCLQDAIDHSGFTILLLTASFDCSLSHQINHALMN 477
BAC44839      LEALGVDPDGFCEDFQVPGRGELSCLQDAIDHSAFIILLTNSNFDCLSLHQNQAMMS 475
               **:*****:***** *****.* *****:*** *****:***.*.

NP_778154      SLTQSGRQDCVIPLLPLECSQAQLSPDTRLLHSIVWLDEHSPIFARKVANTFKTKLQA 537
BAC44839      NLTRQGSPPDCVIPFLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQIFARKVANTFKPHRLQA 535
               .*:.* *****:*****.* *****: ** .:* ***** *****:****

NP_778154      QRVRWKKAQEARTLKEQSIQLEAERQNVA AISAAYTAYVHSYRAWQAEMNKLGVAFGKNL 597
BAC44839      RKAMWRKEQDTRALREQSQHLDGERMQAALNAAYSAYLQSYLSYQAQMEQLQVAFGSHM 595
               :. ** *:*:**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

NP_778154      SLGTPTPSWPGCPQP--IPSHPGGTPVFPYSPQPPSFPQPPCFPQPPSFPQPPSFPPLPP 655
BAC44839      SFGTGAPYGARMFPGGQVPLGAPPPFTWPGCPQPPPLHAWQAGTPPPSPQPAAFPQS- 654
               *:** :* . * :* . *:* .*****: . . **.* ***:**.*.

NP_778154      VSSPQSQSFPSASSPAPQTPGPQPLIIHHAQMVQLGVNNHMMWGHTGAQSSDDKTECSENP 715
BAC44839      LPFPQSPAFPTASPAPPQSPGLQPLIIHHAQMVQLGLNNHMMWNQRGSQAPEDKTQEAE-- 712
               :. *** **:***.*:*:* *****:*****:*****. *:***:***: *

NP_778154      CMGPLTDQGEPLLETPE 732
BAC44839      -----

```

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 NP_778154	732	2 BAC44839	712	55

Das *Alignment* wurde mit dem von EBI (European Bioinformatics Institute) zur Verfügung gestellten Sequenzanalyse Werkzeug, ClustlW, erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). In Fettschrift und grau unterlegt dargestellt ist die NS3/4A Protease Schnittstelle in der humanen TRIF Sequenz.

## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum in Essen, an dem ich seit vier Jahren tätig bin. Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerken, dem Direktor der Abteilung, für seinen finanziellen Beitrag, sowie die Bereitstellung seiner Laboratorien. Danken möchte ich auch PD. Dr. Hilgard, der mir die Arbeit an diesem Institut ermöglichte. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Schlaak, der mir die Fragestellung dieser Arbeit bot und mich in jeder Hinsicht unterstützte, sowohl in der Projektgestaltung, der Veröffentlichung und Präsentation meiner Projektarbeit auf Kongressen, als auch im Abschluss der vorliegenden Dissertation.

Allen meinen Kollegen bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar. Besonders hervorheben möchte ich hierbei meine Kollegin A. Tietjens, die stets zu Diskussionen bereit war, mit ihren Anregungsvorschlägen meine Arbeit weiterbrachte und auch in der Not praktischen und seelischen Beistand bot. Ganz besonderer Dank geht an meine Kollegin J. Wu, deren Hilfe und Unterstützung mich in meiner Arbeit vorangebracht haben und deren Wissen und Vorarbeiten erheblich am Erfolg der Arbeit beigetragen haben. Vielen lieben Dank möchte ich an dieser Stelle meinem Kollegen Dr. M. Trippler widmen, der mir mit seinem technischen Verständnis stets zur Seite stand. Für die Unterstützung im Labor danke ich der technischen Assistentin S. Driftmann die mir viel Arbeit abgenommen hat und ohne die diese Arbeit um einiges länger gedauert hätte. Mein ausdrücklichster Dank geht an meine ehemalige Kollegin und gute Freundin Dr. P. Grünewald, die mir zu Zeiten der gemeinsamen Laborarbeit eine enorme Hilfe war und die mit ihrem Kritikbewußtsein und ihrer wissenschaftlichen Erfahrung stets den richtigen Weg wies. Für die Korrektur dieser Arbeit und ihre konstruktiven Anmerkungen, die ohne Zweifel zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, kann ich mich bei ihr gar nicht genug bedanken. Allen meinen Freunden und Verwandten möchte ich noch meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, wobei ich zuallererst meine Eltern erwähnen möchte, die aufgrund ihrer moralischen und finanziellen Unterstützung während der Zeit meines Studium stets eine hilfreiche und aufmunternde Stütze waren.

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Direkte und indirekte *in vitro* Suppression der Replikation subgenomischer Hepatitis C Virus Replicons“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Ruth Bröring befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers / Mitglieds der  
Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderer als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin

## **Lebenslauf**

Name: Ruth Bröring  
Geburtsdatum: 20.03.1977  
Geburtsort: Damme  
Familienstand: ledig

## **Ausbildung:**

Schule: Grundschule in Damme, 1984-1988  
Orientierungsstufe in Damme, 1988-1990  
Gymnasium in Damme, 1990-1997

Hochschulstudium: Diplomstudiengang Biologie,  
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg,  
1997-2003

**Diplom:** am 30.09.2003

## **Praktische Tätigkeit:**

01/2004 - 12/2005 wissenschaftliche Angestellte,  
Universitätsklinikum Essen  
(Arbeitsgruppe Hilgard)

01/2006 - 12/2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Universitätsklinikum Essen  
(Arbeitsgruppe Schlaak)

## **Veröffentlichungen:**

### Kongresse und Tagungen:

2005: "Differential Role of CEACAM-1 during Interferon-alpha Treatment of HCV Infection *In vivo* and *In vitro*" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Poster Präsentation

2006: "Differentielle Funktion von CEACAM-1 im Rahmen der Therapie der Hepatitis C-Virus Infektion mit Interferon-alpha *in vivo* und *in vitro*" German Association for the Study of the Liver (GASL), Poster Präsentation

2006: "TLR-stimulated non-parenchymal liver cells are potent suppressors of HCV replication" American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Poster Präsentation

2007: "TLR-stimulierte nicht-parenchymatöse Leberzellen supprimieren HCV Replikation" German Association for the Study of the Liver (GASL), Vortrag (in Vertretung durch Prof. Dr. Schlaak)

2007: "TLR-stimulated non-parenchymal liver cells are potent suppressors of HCV replication" European Association for the Study of Liver Diseases (EASL), Poster Präsentation

2007: "Toll-like receptor stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication"  
European Congress of Virology (EUROVirology),  
Poster Präsentation

2007: "Suppression of Hepatitis C Virus *in vitro* is mediated by TLR3- or TLR4-stimulated non-parenchymal liver cells" Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Poster Präsentation

Paper:

Broering et al "Toll-like receptor stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication" (Journal of Hepatology, Paper in Revision)

Wu et al "TLR-mediated control of HBV replication by non-parenchymal liver cells" (Hepatology. 2007 Oct 10;46(6), 1769-1778 [Epub ahead of print].)

**Sonstiges:**

Tierexperimentelles

Arbeiten:

Praktischer Kurs: Fachgerechter Umgang mit den kleinen Labortieren Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen  
(Umfang: 7 Zeitstunden)

Vorlesung Grundlagen tierexperimentellen Arbeitens  
(Umfang 12 Zeitstunden)

Praktischer Kurs: Tierexperimentelles Arbeiten für Mediziner/innen und Naturwissenschaftler/innen mit Hochschulabschluss  
(Umfang: 12 Zeitstunden)

EDV: fortgeschrittene Kenntnisse in Word, Exel und Powerpoint sowie im allgemeinen Umgang mit dem PC und dem Internet

Sprachen: gute Englischkenntnisse

Essen, Dezember 2007

---

Ruth Bröring